



SKRIPSI

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK
METANOL PROPOLIS DARI SARANG LEBAH
Trigona sp. TERHADAP AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN YOGHURT**

**NIA PARAMITHA
NRP : 01211440000096**

**Dosen Pembimbing 1
Herdayanto Sulistyو Putro, S.Si, M.Si.**

**Dosen Pembimbing 2
Zjahra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.**

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**



UNDERGRADUATE THESIS

**THE EFFECTS OF METHANOLIC PROPOLIS
EXTRACT ADDITION FROM *Trigona* sp.
BEEHIVES AGAINST YOGHURT'S
ANTIOXIDANT ACTIVITY**

NIA PARAMITHA

Student Number : 01211440000096

Advisor I

Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si, M.Si.

Advisor II

Zjahra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

SURABAYA

2018

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK METANOL
PROPOLIS DARI SARANG LEBAH *Trigona* sp.
TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
YOGHURT**

SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Program Studi S-1
Departemen Kimia
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Disusun Oleh:

NIA PARAMITHA
NRP 01211440000096

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**

LEMBAR PENGESAHAN
PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK
METANOL PROPOLIS DARI SARANG LEBAH
***Trigona* sp. TERHADAP AKTIVITAS**
ANTIOKSIDAN YOGHURT
SKRIPSI

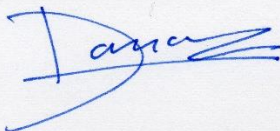
Disusun oleh:

NIA PARAMITHA
NRP 01211440000096

Surabaya, 23 Januari 2018

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I



Herdayanto S. Putro, S.Si, M.Si.
NIP. 19810125 200812 1 001

Dosen Pembimbing II




Zjakra Vianita Nugraheni, S. Si., M. Si.
NIP. 19900901 201504 2 001

Mengetahui,

Kepala Departemen Kimia




Prof. Dr. Didik Prasetyoko, S.Si., M.Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK METANOL
PROPOLIS DARI SARANG LEBAH *Trigona* sp.
TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

YOGHURT

Nama	: Nia Paramitha
NRP	: 01211440000096
Departemen	: Kimia FIA - ITS
Dosen Pembimbing I	: Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si, M.Si.
Dosen Pembimbing II	: Zjahra Vianita Nugraheni, S. Si, M.Si.

Abstrak

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi propolis dari sarang lebah *Trigona* sp. menggunakan pelarut metanol untuk mengetahui kandungan total fenolik, flavonoid, dan protein yang terdapat dalam ekstrak propolis. Ekstrak metanol propolis yang diperoleh ditambahkan ke dalam yoghurt. Kandungan total fenolik yang diperoleh sebesar $45,804 \pm 0,511$ $\mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering. Kandungan total flavonoid dalam ekstrak propolis sebesar $12,075 \pm 0,214$ $\mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering. Kandungan total protein dalam ekstrak propolis adalah sebesar $24,931$ $\mu\text{g BSA/g}$ sarang lebah kering. Aktivitas antioksidan propolis terhadap radikal DPPH yang diperoleh adalah 82,655%. Pada analisis menggunakan KG-SM dapat diketahui kandungan senyawa dalam ekstrak propolis yaitu 1,2 dimetoksi-4-(2-propenil)benzena, 3-(4-hidroksifenil)-1-propanol, dan (Z)- Asam 6-Oktadekenoat.. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak propolis pada yoghurt dapat meningkatkan nilai gizi dengan meningkatkan aktivitas antioksidannya.

Kata kunci: Propolis, fenolik, flavonoid, aktivitas antioksidan

**ADDITION EFFECTS OF METHANOLIC
PROPOLIS EXTRACT FROM *Trigona* sp.
BEEHIVES AGAINST YOGHURT'S
ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Name : Nia Paramitha
Student Number : 01211440000096
Department : Chemistry FIA - ITS
Advisor I : Herdayanto Sulistyo Putro, S.Si,
M.Si.
Advisor II : Zjahra Vianita Nugraheni, S. Si,
M.Si.

Abstract

In this research, extraction of propolis had been done from *Trigona* sp. beehives using a methanol as a solvent to determine the total phenolic, flavonoid, and protein content in the propolis extract. The obtained propolis extract was added into the yoghurt. The total phenolic content was $45,804 \pm 0,511 \mu\text{g AGE} / \text{g dry beehives}$. The total flavonoids in propolis extract was $12,075 \pm 0.214 \mu\text{g KE} / \text{g dry beehives}$. The total protein in the propolis extract was $24,931 \mu\text{g BSA} / \text{g dry beehives}$. Free radical scavenging activity against DPPH radical was 82,655%. In the GC-MS analysis, the content of compounds in propolis extract can be seen as 3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)benzene, and (Z)-6-Octadecenoic acid. Based on the research, it can be concluded that the addition of propolis extract in yoghurt can enhance yoghurt's nutritional value by increasing its antioxidant activity.

Keywords: *propolis, phenolic, flavonoid, antioxidant activity*

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Puji dan syukur penulis sampaikan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya, sehingga naskah skripsi yang berjudul **“PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK METANOL PROPOLIS DARI SARANG LEBAH *Trigona* sp. TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN YOGHURT.”** dapat terselesaikan. Ucapan terimakasih tak lupa penulis sampaikan kepada:

1. Herdayanto S. Putro, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing pertama yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, dan ilmunya kepada penulis dari awal proses penelitian, hingga proses penyusunan naskah skripsi.
2. Zjakra Vianita Nugraheni, S.Si., M.Si., selaku Dosen Wali dan pembimbing skripsi yang telah membimbing dan memberikan arahan dalam hal akademik maupun non akademik penulis selama menempuh studi di Departemen Kimia FMIPA ITS.
3. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc., selaku Kepala Departemen Kimia ITS atas fasilitas yang diberikan selama proses penelitian.
4. Dr. Yulfi Zetra, M.S., selaku Kepala Laboratorium Geokimia Molekuler, yang telah memberikan izin penggunaan laboratorium.
5. Dosen dan Staf Tenaga Kependidikan Departemen Kimia FIA ITS.

6. Keluarga besar saya, terutama Mama dan Ayah yang telah memberikan dukungan, semangat, dan do'a yang luar biasa untuk saya.
7. Nur Hasanah partner tugas akhir yang sangat sabar dan telaten. Semangat untuk skripsinya di semester 8.
8. Malinda Syifa dan Hesti Selfiana atas dukungannya selama ini.
9. Hernawan Andriana dan Linda Oktavia yang selalu sabar mendengar keluh kesah selama penulisan tugas akhir.
10. Semua pihak yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak mungkin saya sebutkan seluruhnya.

Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi penulis, pembaca, maupun mahasiswa-mahasiswa yang ingin melanjutkan penelitian lebih lanjut tentang propolis *Trigona* sp.

Surabaya, 26 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Propolis.....	5
2.2 Komposisi Propolis.....	5
2.2.1 Senyawa Fenolat.....	6
2.2.2 Flavonoid.....	7
2.3 Ekstraksi Propolis	8
2.3.1 Bioaktivitas Propolis.....	9
2.4 Uji Antioksidan Metode DPPH.....	10
2.5 Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis).....	12
2.6 Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM).....	15
2.7 Uji Protein Metode Bradford	17
2.8 Yoghurt	18
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1 Alat	21
3.2 Bahan	21
3.3 Prosedur.....	22
3.3.1 Ekstraksi Propolis.....	22
3.3.2 Penentuan Kandungan Total Fenolik.....	22
3.3.3 Penentuan Kandungan Total Flavonoid	23
3.3.4 Penentuan Total Protein Metode Spektroskopi.....	23
3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	24
3.3.6 Pembuatan Yoghurt	24

3.3.7 Fortifikasi Yoghurt.....	25
3.3.8 Analisis KG-SM	25
BAB IV PEMBAHASAN.....	27
4.1 Ekstraksi Propolis.....	27
4.2 Kandungan Total Fenolik	28
4.3 Kandungan Total Flavonoid	28
4.4 Penentuan Kadar Protein dalam Ekstrak Propolis....	29
4.5 Aktivitas Antioksidan Propolis.....	30
4.6 Fortifikasi Yoghurt	31
4.6.1 Pembuatan Yoghurt	31
4.6.2 Penambahan Ekstrak Propolis ke Dalam Yoghurt.	32
4.6.3 Aktivitas Antioksidan Yoghurt	33
4.7 Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	53
BIODATA PENULIS	84

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur Asam Galat	7
Gambar 2. 2 Struktur Dasar Flavonoid	8
Gambar 2. 3 Mekanisme Reaksi Kuersetin dan DPPH ...	12
Gambar 2.4 Skema Kerja Spektrofotometer UV-Vis.....	15
Gambar 2. 5 Skema Kerja KG-SM.....	16
Gambar 2. 6 Skema reaksi analisis protein dengan pewarna Coomassie (Bradford)	17
Gambar 4. 1 Ekstrak Propolis dengan Pelarut Metanol ..	27
Gambar 4. 2 Kondisi yoghurt 24 jam inkubasi	31
Gambar 4. 3 Grafik Hubungan % Dekolorisasi dengan Hari Inkubasi	34
Gambar 4. 4 Timbulnya Whey pada Yoghurt	34
Gambar 4. 5 Kromatogram KG	36
Gambar 4. 6 Spektra massa metabolit A dengan m/z 178,2 g/mol	36
Gambar 4. 7 Spektra massa 1,2 dimetoksi-4(2- propenil)benzena dari <i>database</i>	37
Gambar 4. 8 Spektra Massa Metabolit B dengan m/z 152,1 g/mol	37
Gambar 4. 9 Spektra massa 3-(4-hidroksifenil)-1-propanol dari <i>database</i>	38
Gambar 4. 10 Spektra Massa senyawa Metabolit C dengan m/z 282 g/mol	38
Gambar 4. 11 Spektra massa 3-(4-hidroksifenil)-1- propanol dari <i>database</i>	39

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Tabel Pengamatan pH Yoghurt Hari ke-1 sampai ke-30	32
Tabel 4. 2 Tabel % Dekolorisasi Yoghurt A, B, dan C ..	33

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Propolis adalah produk lebah yang dikumpulkan dari lebah madu yang digunakan pada sarang lebah sebagai pelindung dan penghalang mikroorganisme patogen (Silva, dkk., 2012). Secara umum, propolis mengandung 50% resin, 30% lilin, 10% minyak aromatic dan esensial, 5% *pollen*, dan 5% bahan lain (Marcucci, 1995). Berdasarkan komposisi propolis tersebut, maka propolis dimanfaatkan sebagai objek penelitian untuk mendeskripsikan fungsi antibakterial, antivirus, antioksidan, antipembengkakan, dan antikanker (Silva, dkk., 2012; Doborowski, dkk., 1991). Dari bioaktivitas yang dimiliki tersebut, propolis dapat digunakan dalam berbagai bidang misalnya sebagai aditif dalam makanan. Berdasarkan penelitian Mishima, dkk., (2005) propolis dapat digunakan sebagai pengawet untuk makanan dan ditambahkan ke makanan dan minuman sebagai sumber senyawa bioaktif untuk meningkatkan kesehatan. Penambahan propolis ke dalam makanan sosis telah dilakukan dalam penelitian Viera, dkk., (2016).

Produk-produk makanan, seperti produk olahan susu telah diketahui memegang peranan penting dalam makanan di berbagai negara. Dengan tingkat nutrisinya yang tinggi, produk olahan susu dapat dijadikan makanan tambahan walaupun susu dan hasil olahannya hanya mewakili sekitar 10% konsumsi total protein yang dibutuhkan oleh manusia (McLean, 1982). Salah satu produk olahan susu adalah yoghurt. Yoghurt berasal dari susu yang kemudian

ditambahkan dengan bakteri yang akan membentuk asam laktat. Bakteri yang biasa digunakan dalam proses pembuatan yoghurt adalah bakteri *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Bakteri-bakteri ini yang akan memicu proses fermentasi dari susu, mengubah laktosa pada susu menjadi asam laktat (Alimentarius, 1976). Yoghurt memiliki manfaat untuk melancarkan pencernaan, mengurangi kadar kolesterol, menurunkan tekanan darah, dan mencegah penyakit kronis (Sanders, 1999). Aktivitas antioksidan yoghurt dengan starter *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* berdasarkan penelitian Gjorgievski, dkk., (2015) adalah sebesar 45,18%.

Berdasarkan uraian di atas, dalam penelitian ini akan dilakukan penambahan propolis sebagai aditif alami ke dalam yoghurt untuk melihat apakah propolis dapat meningkatkan fungsi dan nilai gizi yoghurt. Propolis dari sarang lebah diekstrak menggunakan metanol dikarenakan menurut penelitian Hariyanto, dkk., (2017) pelarut metanol merupakan pelarut yang paling efektif untuk mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid dalam propolis dari sarang lebah *Trigona* sp.

1.2 Permasalahan

Berdasarkan penjelasan yang telah disampaikan dalam latar belakang, maka rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah meningkatkan nilai antioksidan dari yoghurt dengan cara fortifikasi. Yoghurt merupakan minuman yang bermanfaat untuk melancarkan pencernaan. Untuk menambah nilai fungsi yoghurt sebagai antioksidan, diperlukan suatu bahan aditif alami. Propolis merupakan

resin yang dihasilkan lebah madu. Propolis yang digunakan berasal dari sarang lebah *Trigona* sp. yang diekstrak dalam pelarut metanol. Pelarut metanol dipilih karena berdasarkan penelitian Hariyanto, dkk., (2017) merupakan pelarut yang paling efektif untuk mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid yang terdapat dalam propolis. Senyawa fenolik dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak propolis berperan sebagai senyawa antioksidan. Untuk mengetahui komposisi dari ekstrak propolis dilakukan analisis kandungan total fenolik, flavonoid, dan protein. Ekstrak propolis yang diperoleh ditambahkan ke dalam yoghurt dan dilihat aktivitas antioksidannya.

1.3 Tujuan

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui total senyawa fenolik, flavonoid, dan protein dalam ekstrak propolis.
2. Untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan dari ekstrak propolis.
3. Mengetahui pengaruh penambahan ekstrak propolis dalam yoghurt terhadap aktivitas antioksidan.

1.4 Batasan Masalah

Propolis yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari sarang lebah *Trigona* sp. yang berasal dari peternakan lebah “Petik Madu” di Lawang, Malang. Propolis diekstrak menggunakan pelarut methanol dan diuji kandungan total fenolik, flavonoid, protein serta aktivitas antioksidannya. Ekstrak propolis yang diperoleh

ditambahkan ke dalam yoghurt dengan variasi volume penambahan yaitu 40 mL (A), 80 mL (B), serta 100 mL (C). Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan reagen 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengetahui manfaat propolis sebagai bahan preservatif alami dan mengetahui aktivitas antioksidan yoghurt yang ditambahkan ekstrak propolis dari sarang lebah *Trigona* sp. yang berasal dari Malang, Jawa Timur.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Propolis

Propolis adalah produk resin hijau kecokelatan alami yang berasal dari lebah madu. Propolis digunakan untuk membuat lapisan pelindung jalan masuk pada sarang lebah (Ghiralverti, 1979). Karena teksturnya yang seperti lilin dan sifat mekanisnya, propolis digunakan oleh lebah madu sebagai cairan untuk menjaga suhu dan kelembaban sarang stabil sepanjang tahun. Pada suhu tinggi, propolis bersifat lunak dan sangat lengket; sedangkan saat didinginkan dan ketika dibekukan atau mendekati beku, propolis menjadi keras dan rapuh. Propolis tetap rapuh setelah diperlakukan demikian bahkan pada suhu lebih tinggi (Sforcin, 2016).

Sejak dahulu, manusia telah menggunakan propolis untuk berbagai keperluan pengobatan tradisional (Havsteen, 1983). Pada zaman Yunani kuno, propolis digunakan sebagai desinfektan dan antiseptik bagi infeksi. Masyarakat Mesir pada umumnya menggunakan propolis untuk mengawetkan mayat. Penggunaan propolis telah berkembang seiring waktu. Kini, perkembangan riset pada propolis umumnya berhubungan dengan perkembangan kimia dan metode analitis untuk menganalisis komposisi kimia dari propolis (Burdock, 1998).

2.2 Komposisi Propolis

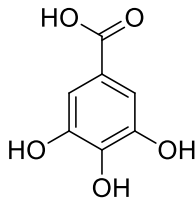
Analisis sampel-sampel propolis dari berbagai belahan dunia dilaporkan mengandung lebih dari 300 senyawa kimia yang berbeda (Huang, dkk., 2014). Propolis mentah umumnya tersusun dari 50% resin tanaman, 30%

lilin, 10% minyak aromatis & esensial, 5% polen dan 5% zat organik lainnya (Bankova, 2005a). Menurut Bankova. (2005b), melalui beberapa teknik analisis menggunakan instrumen seperti Spektroskopi Massa (MS), Resonansi Magnetik Nuklir (NMR), Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM) telah memungkinkan untuk mengidentifikasi beberapa senyawa aktif kimiawi namun tidak untuk menentukan komposisi senyawa. Kelompok gugus kimia utama yang muncul pada resin propolis meliputi asam fenolat atau ester-esternya, flavonoid, terpen, aldehid dan alkohol aromatis, asam lemak, stilben dan steroid- β (Watanabe, dkk., 2011). Propolis juga mengandung mineral-mineral seperti magnesium, kalsium, iodine, kalium, natrium, tembaga, seng, mangan, dan besi serta beberapa vitamin seperti B1, B2, B6, C, E, dan D, seperti halnya pro vitamin A. Propolis juga mengandung sedikit asam lemak; dan beberapa enzim yang diturunkan dari sekresi kelenjar lebah atau kemungkinan berasal dari putik seperti suksinat dehidrogenase, adenosine trifosfatase, glukosa-6-fosfatase, asam fosfatase, α -amilase, β -amilase, α -laktamase, β -laktamase, maltase, esterase, dan transhidrogenase. Polisakarida, seperti kanji dan glukosa monosakarida, fruktosa, ribosa, ramnosa, talosa, gulosa, dan sukrosa pada umumnya juga terkandung dalam propolis (Silva, dkk., 2015).

2.2.1 Senyawa Fenolat

Senyawa fenolat adalah senyawa-senyawa yang tersusun dari cincin benzena, gugus karboksil dan hidroksil. Aktivitas antioksidatif dari senyawa-senyawa fenolat bergantung pada jumlah gugus hidroksil dan efek

steriknya (Leja, dkk., 2007). Menurut Makowska-Was dan Janeczko, Z., (2004) mekanisme aktivitas antioksidan dari senyawa fenolat adalah menghambat aktivitas enzim yang membentuk oksigen reaktif, mengkhelat ion logam yang berpartisipasi dalam pembentukan radikal bebas, menangkap oksigen reaktif sehingga menginterupsi reaksi peroksidasi lemak, serta bersinergi dengan antioksidan lainnya. Turunan asam fenolat menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling kuat ketika gugus hidroksil muncul pada posisi 3 dan 5. Menurut Rice-Evans, dkk., (1996) di antara turunan asam fenolat, asam galat mengandung tiga gugus hidroksil pada posisi 3, 4, dan 5 dan dikarakterisasi memiliki aktivitas antioksidatif yang sangat baik. Struktur asam galat dapat dilihat pada Gambar 2.1.

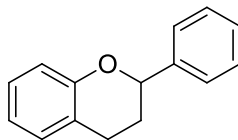


Gambar 2. 1 Struktur Asam Galat

2.2.2 Flavonoid

Flavonoid termasuk gugus polifenol yang memiliki beragam struktur dan sifat. Flavonoid paling banyak ditemukan dalam tanaman. Elemen dasar struktur flavonoid (Gambar 2.2) adalah unit C6-C3-C6 terdiri dari 15 atom karbon, termasuk cincin benzena dan unit fenilpropana. Mayoritas senyawa flavonoid membentuk sistem heterosiklik yang mengandung oksigen di antara

cincin aromatis yang mereka miliki. Oleh karena itu, senyawaan ini dinyatakan sebagai turunan *chromone*. Flavonoid dikarakterisasi memiliki sifat antioksidatif yang kuat. Gugus *o*-dihidroksi pada cincin B, menunjukkan aktivitas signifikan untuk menangkal radikal bebas oksigen (ROS) dan radikal bebas nitrogen (RNS) membentuk radikal fenoksil dengan stabilitas tinggi. Sifat antioksidatif terkuat ditunjukkan oleh flavon-3-ol (kuersetin, mirisetin, dan morin), flavan-3-ol katekin, dan antosianidin (Kohlmunzer, 2003; Tapas, dkk., 2008). Banyak senyawa flavonoid secara efektif mengkhelat ion logam transisi (pada umumnya Cu dan Fe, di samping fungsi mereka sebagai kofaktor enzim), memiliki peran yang penting dalam metabolisme oksigen serta menghambat reaksi radikal lemak bebas menghasilkan radikal yang kurang reaktif dan bila bereaksi lebih lanjut membentuk struktur yang stabil (Ostrowska dan Skrzydlewska, 2005).



Gambar 2. 2 Struktur Dasar Flavonoid

2.3 Ekstraksi Propolis

Metode ekstraksi maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling banyak digunakan untuk mengekstrak senyawa antioksidan dari suatu produk bahan alam, baik dari tanaman, maupun dari hewan, dikarenakan metode yang sederhana dan biaya yang murah (Peschel, dkk., 2006 ; Sultana, dkk., 2009). Pada metode ekstraksi maserasi, sampel propolis mentah dengan berat tertentu

ditempatkan dalam suatu wadah tertutup berisi pelarut dalam volume tertentu, kemudian didiamkan selama jangka waktu tertentu dalam suhu kamar, lalu disaring, sehingga mendapatkan ekstrak propolis dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi (Handa, dkk., 2008). Pemilihan pelarut merupakan faktor yang sangat penting dalam metode maserasi. Pelarut yang digunakan haruslah mempunyai karakteristik yang sesuai dengan karakteristik senyawa yang ingin diekstrak (Peschel, dkk., 2006 ; Sultana, dkk., 2009).

Pelarut alkohol seperti metanol dan juga etanol, merupakan pelarut yang paling umum digunakan untuk mengekstrak propolis. Pelarut lainnya yang biasa digunakan untuk mengekstrak propolis adalah air. Penggunaan air sebagai pelarut hanya dapat melarutkan sebagian kecil dari senyawa aktif penyusun propolis atau sekitar 10% dari berat propolis. (Bankova dkk., 1992).

2.3.1 Bioaktivitas Propolis

Aktivitas biologis dari propolis utamanya disebabkan karena gugus fenolik (termasuk flavon, flavonol, flavanon, dan dihidroflavonol) dan fenolik lain (utamanya substitusi asam sinamat dan ester mereka (Huang, dkk., 2014) dan salah satu bioaktivitas yang paling dikenal adalah efek antioksidan. Menurut Valencia, dkk., (2012) propolis memiliki rentang spektra yang lebar dari aktivitas biologis termasuk antikanker. Selain itu propolis juga memiliki manfaat sebagai antioksidan (Sulaiman, dkk., 2011), antijamur (Majiene, dkk., 2007), antibakterial (Velazquez, dkk., 2007 ; Silva, dkk., 2012), antivirus (Schnitzler, dkk.,

2010), stimulan sistem imun dan antipembengkakan (Silva, dkk., 2012 ; Paulino, dkk., 2003).

2.3.1.1 Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dari propolis bergantung pada kandungan polifenol seperti asam fenolat dan flavonoid. Senyawa polifenol memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim yang berpartisipasi dalam pembentukan bentuk reaktif dari oksigen. Polifenol menurunkan aktivitas xanthine oksidase, oksidasi dari NADPH tereduksi yang bertanggung jawab terhadap kemunculan superoksida anion radikal. Banyak senyawa flavonoid secara efektif mengkhelat ion logam transisi, secara umum besi dan tembaga, yang selain membentuk fungsi fisiologis dalam organisme memiliki peran penting dalam metabolisme oksigen (Majewska dan Czczot, 2009; Pietta, 2000; Harborne dan Williams, 2000).

Di bidang industri pangan, antioksidan dapat digunakan untuk mencegah proses oksidasi yang dapat menyebabkan kerusakan, seperti ketengikan, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lainnya (Tamat, dkk., 2007). Peroksidasi lipid merupakan reaksi kimia yang sering terjadi pada bahan pangan yang memproduksi asam, aroma tak sedap dan toksik selama proses pengolahan dan penyimpanan sehingga mempengaruhi mutu dan keamanan produk pangan (Heo, dkk., 2005).

2.4 Uji Antioksidan Metode DPPH

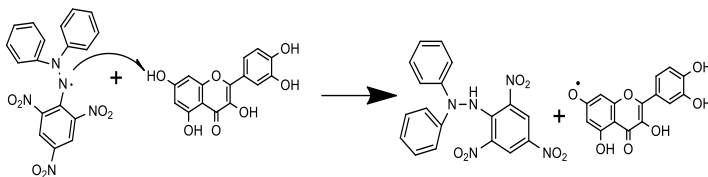
Senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil atau yang biasa dikenal dengan DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang banyak digunakan dalam pengujian aktivitas

antioksidan. Senyawa ini akan bereaksi dengan senyawa yang memiliki sifat antioksidan, dimana senyawa antioksidan ini akan mendonorkan satu elektronnya untuk menstabilkan senyawa DPPH radikal tersebut (Hidayati, 2015). Senyawa DPPH merupakan senyawa berwarna ungu tua, yang akan memberikan nilai absorbansi maksimum pada kisaran panjang gelombang 512-520 nm. Pada saat senyawa ini bereaksi dengan senyawa antioksidan, maka DPPH akan berubah warna dari ungu tua menjadi berwarna kuning (Carmona-Jiménez, dkk., 2014). Metode DPPH merupakan metode untuk mengukur aktivitas antioksidan yang mempunyai kelebihan yaitu sederhana, cepat dan terbukti akurat (Prakash, dkk., 2001). Cara kerja metode ini yang sederhana, dimana cukup dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis, membuat metode ini banyak digunakan untuk mengukur aktifitas antioksidan (Karadag, dkk., 2009).

DPPH telah digunakan secara luas untuk mengevaluasi efektivitas penangkalan radikal bebas dari beberapa senyawa antioksidan. Dalam assay DPPH, antioksidan mampu untuk mendonasikan hydrogen untuk mereduksi radikal stabil DPPH menjadi non radikal berwarna kuning yaitu difenil pikrilhidrazin (DPPH-H). DPPH biasanya digunakan sebagai reagen untuk mengevaluasi aktivitas penangkalan radikal bebas oleh antioksidan berdasarkan perubahan serapan DPPH pada 517 nm diukur dengan spektrofotometer.

Gambar 2.3 menunjukkan prinsip kerja dari senyawa DPPH, di mana senyawa ini akan menangkap donor elektron ataupun atom hidrogen dari senyawa antioksidan. Interaksi tersebut akan menyebabkan terjadinya perubahan

warna serapan maksimum dari ungu menjadi kuning, pada panjang gelombang maksimum 515-520 nm. Perubahan warna ini menunjukkan bahwa radikal DPPH telah berikatan dengan antioksidan (Martysiak-Żurowska dan Wenta, 2012).



Gambar 2. 3 Mekanisme Reaksi Kuersetin dan DPPH

2.5 Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu metode instrumen untuk mempelajari serapan atau emisi radiasi gelombang elektromagnetik sebagai fungsi panjang gelombang tertentu dengan molekul senyawa atau atom dari suatu zat kimia. Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Larutan sampel diabsorpsi oleh sumber radiasi elektromagnetik dan jumlah yang diabsorpsi sebanding dengan konsentrasi larutan sampel (Mulja dan Syahrani, 1990).

Spektrofotometri UV-Vis memiliki dua daerah pengukuran dan panjang gelombang yang berbeda yaitu daerah radiasi ultraviolet pada panjang gelombang 220-380 nm dan daerah radiasi sinar tampak (*visible*) pada panjang gelombang 380-780 nm. Informasi yang dapat diperoleh dari spektra UV-Vis adalah adanya gugus berikatan rangkap atau terkonjugasi yang mengadsorpsi radiasi elektromagnetik di daerah UV-Vis.

Spektrum UV-Vis disebut juga spektrum elektronik, karena terjadi sebagai hasil interaksi cahaya UV-Vis terhadap molekul yang mengakibatkan molekul tersebut mengalami transisi elektronik. Dalam metode spektrofotometri UV-Vis, berlaku hukum dasar yaitu hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa absorbansi berbanding lurus dengan tebal medium dan konsentrasi larutan. Secara matematis hukum Lambert-Beer dapat dituliskan dalam persamaan 2.1

$$\text{Log } I_0/I_t = A \quad \text{atau} \quad A = \epsilon b c \quad (2.1)$$

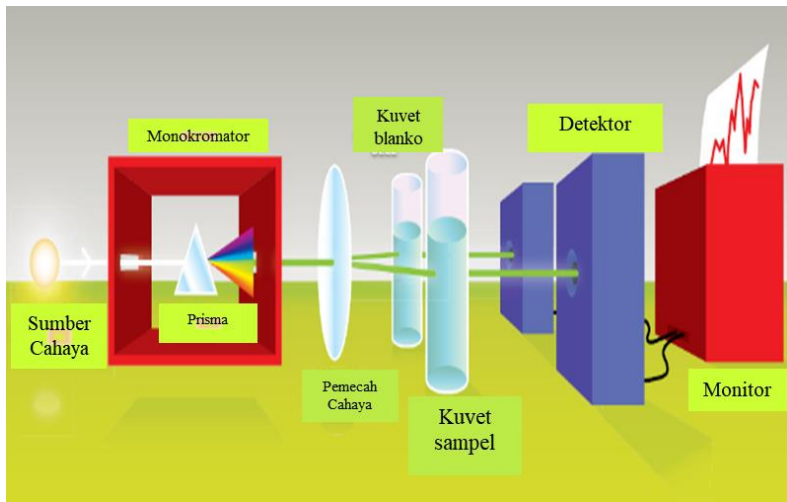
Dimana, I_0 = intensitas cahaya datang ($\text{joule/m}^2\text{s}$), I_t = intensitas cahaya yang diteruskan ($\text{joule/m}^2\text{s}$), ϵ = absorpsivitas molar ($\text{L.cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$), b = tebal kuvet (cm), c = konsentrasi larutan (mol L^{-1}), dan A = absorbansi. Jika konsentrasi dinyatakan dalam g/L , maka :

$$A = a b c \quad (2.2)$$

Dimana, a = absorpsivitas ($\text{L.g}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

Skema kerja dari spektrofotometer UV-Vis, secara singkat dapat dilihat pada Gambar 2.4. Pada Gambar 2.4, sumber cahaya dari spektrofotometer UV-Vis yang berasal dari lampu deuterium, untuk panjang gelombang 190 nm hingga 380 nm. Selanjutnya, untuk panjang gelombang 380 nm hingga 900 nm, digunakan sumber radiasi tungstein, yang merupakan campuran dari filamen tungsten dan gas iodin. Cahaya yang dihasilkan merupakan cahaya putih dengan berbagai macam panjang gelombang, atau

yang biasa disebut dengan cahaya polikromatis. Cahaya polikromatis dari sumber radiasi ini, selanjutnya akan didispersikan menjadi cahaya monokromatis atau yang lebih dikenal dengan “me, ji, ku, hi, bi, ni, u” (merah, jingga, kuning, hijau, biru, nila dan ungu). Cahaya akan masuk menuju monokromator melalui celah masuk (*entrance slit*), lalu didispersikan oleh prisma, kisi, atau kombinasi dari keduanya. Cahaya monokromatis yang dihasilkan, akan keluar melalui celah keluar dari monokromator (*exit slit*) (Mulja and Suharman, 1995). Setelah melewati monokromator, cahaya monokromatis diarahkan melewati alat pemecah cahaya (*beam splitter*), akan dibagi menjadi dua. Pertama, cahaya tersebut akan diarahkan melewati kuvet yang berisi sampel yang akan dianalisa dan sebagian cahaya lainnya diarahkan melewati kuvet yang berisi larutan blanko. Jika senyawa yang akan dianalisa menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu, maka intensitas cahaya sampel (I_s), akan lebih kecil daripada intensitas cahaya blanko (I_b). Setelah melewati sampel dan blanko, cahaya monokromatis akan menuju detektor. Pada detektor, sinyal radiasi yang datang akan dikonversi menjadi sinyal elektronik (Rouessac dan Rouessac, 1994). Selanjutnya, didapatkan data berupa spektrum grafik absorbansi terhadap panjang gelombang (Solomon, 1976).



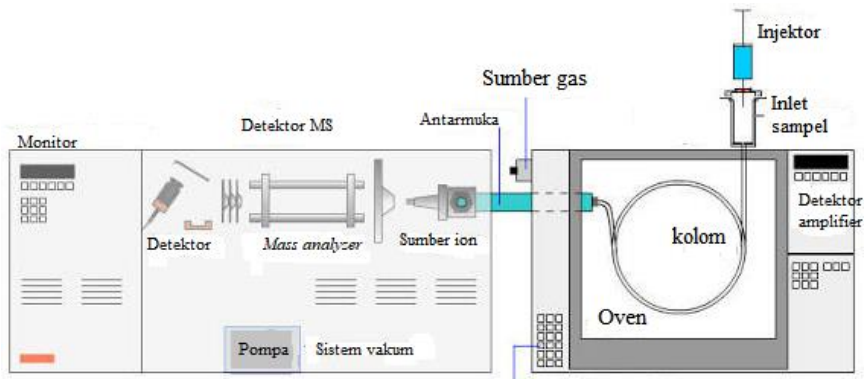
Gambar 2.4 Skema Kerja Spektrofotometer UV-Vis
Sumber : *The Royal Society*

2.6 Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM)

Kromatografi gas-spektrofotometer masa adalah metode kromatografi yang mengombinasikan antara kromatografi gas – cair dan spektrofotometer massa untuk menganalisa dan mengidentifikasi substansi – substansi dalam suatu sampel. Sistem kromatograsi gas terdiri dari beberapa komponen yaitu fase diam, gas pembawa, injektor, kolom pemisah, dan detektor. Fase diam pada KG biasanya berupa cairan yang disaputkan pada bahan penyangga padat yang lembam, sedang fase gerak (gas pembawa) digunakan gas yang inert seperti helium, argon, nitrogen dan hidrogen (Hendayana, 2006).

Skema kerja KG-SM dapat dilihat pada Gambar 2.5. Mekanisme kerja kromatografi gas adalah sebagai berikut.

Gas dalam silinder baja yang bertekanan tinggi dialirkan melalui kolom yang berisi fase diam. Cuplikan yang dianalisa diinjeksikan kedalam aliran gas tersebut sehingga akan terbawa bersama gas pembawa masuk ke dalam kolom tempat terjadinya proses pemisahan. Komponen-komponen campuran yang sudah terpisah satu persatu meninggalkan kolom dan akan mengenai detektor diujung kolom sehingga masing-masing komponen campuran akan dapat terdeteksi. Rekaman hasil pendeteksian berupa kumuplan puncak (*peak*) dan disebut kromatogram.



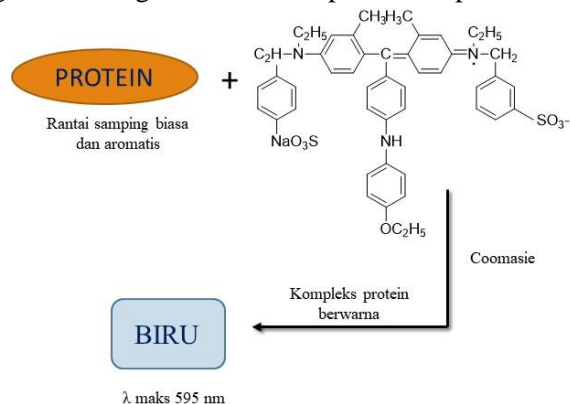
Gambar 2. 5 Skema Kerja KG-SM (Sumber : Crawford Scientific)

Kromatografi gas merupakan metode yang tepat dan cepat untuk menganalisa dan memisahkan campuran yang sangat rumit. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan menggunakan waktuambat (waktu retensi) yang khas pada kondisi yang tepat. Pada KG-SM, spektrometer massa mampu menganalisa cuplikan yang jumlahnya sangat kecil dan masing-masing puncak dari data kromatogram yang diperoleh dapat memberi informasi

mengenai struktur dan identitas senyawa berdasarkan pada ion fragmen karakteristik (Gritter dkk., 1991).

2.7 Uji Protein Metode Bradford

Dalam suasana asam, protein mengikat pewarna Coomassie. Hal ini menghasilkan pergeseran spektral dari bentuk pewarna kemerahan / coklat (absorbansi maksimal 465 nm) ke biru (absorbansi maksimal 610nm) (Gambar 2.5). Perbedaan antara kedua bentuk zat warna paling besar adalah pada 595 nm, merupakan panjang gelombang optimal untuk mengukur warna biru dari kompleks protein pewarna Coomassie. Jika diinginkan, warna biru bisa diukur pada panjang gelombang antara 575 nm dan 615 nm. Pada dua panjang gelombang ekstrem (575 nm dan 615 nm) terdapat kehilangan sekitar 10% dalam jumlah warna yang diukur (absorbansi) dibandingkan dengan yang diperoleh pada 595 nm. Mekanisme reaksi analisis protein menggunakan reagen Bradford dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2. 6 Skema reaksi analisis protein dengan pewarna Coomassie (Bradford)

Pengembangan warna dalam tes protein berbasis protein Coomassie telah dikaitkan dengan adanya asam amino dasar tertentu (terutama arginin, lisin dan histidin) dalam protein. Jumlah ligan Coomassie dye yang terikat pada masing-masing molekul protein kira-kira sebanding dengan jumlah muatan positif yang ditemukan pada protein. Asam amino bebas, peptida dan protein dengan berat molekul rendah tidak menghasilkan warna dengan reagen pewarna Coomassie. Secara umum, massa peptida atau protein minimal harus 3.000 Dalton untuk diuji dengan reagen ini. Dalam beberapa aplikasi ini bisa menjadi keuntungan.

2.8 Yoghurt

Yoghurt merupakan salah satu produk fermentasi susu dengan bantuan bakteri asam laktat (BAL). Menurut Astawan (2008), yoghurt mempunyai banyak manfaat bagi tubuh antara lain mengatur saluran pencernaan, antidiare, antikanker, meningkatkan pertumbuhan, membantu penderita lactose intolerance dan mengatur kadar kolesterol dalam darah. Karakteristik yoghurt seperti rasa yang asam dan tekstur yang kental menjadikan beberapa orang tidak menyukainya. Diperlukan adanya diversifikasi dalam pembuatan yoghurt, yaitu dengan membuat produk yoghurt yang tidak terlalu asam dengan menghentikan waktu fermentasi pada tingkat keasaman yang diinginkan dan tekstur yang tidak kental (encer) sehingga mudah untuk diminum yang biasa disebut *drink* yoghurt (Hidayat, 2013).

Pada pembuatan yoghurt dilakukan proses fermentasi dengan memanfaatkan bakteri asam laktat misalnya dari

golongan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. *Streptococcus thermophilus* berkembang biak lebih cepat dan menghasilkan baik asam maupun CO₂. Asam dan CO₂ yang dihasilkan tersebut kemudian merangsang pertumbuhan dari *Lactobacillus bulgaricus*. Di sisi lain, aktivitas proteolitik dari *Lactobacillus bulgaricus* memproduksi peptida penstimulasi dan asam amino untuk dapat dipakai oleh *Streptococcus thermophilus*. Mikroorganisme ini sepenuhnya bertanggung jawab atas pembentukan tekstur dan rasa yoghurt (Ginting dan Pasaribu, 2005). Rasa asam pada yoghurt merupakan indikasi perkembangbiakan dari percampuran bakteri yang berjalan baik dan cepat. Rasa asam pada yoghurt juga menunjukkan bahwa adanya asam laktat yang telah terbentuk sebagai hasil kerja dari bakteri. Suhu memegang peranan penting bagi pertumbuhan bakteri. Dalam pengembangbiakannya dengan cara membelah diri, bakteri memerlukan suhu dan keadaan lingkungan tertentu sehingga daur hidupnya dapat terus berjalan (Ginting & Pasaribu, 2005).

Menurut Hefner dan Wishoff (1978), umumnya bakteri *Streptococcus* adalah penghasil asam laktat, tumbuh sangat baik pada pH 6,5 dan pertumbuhannya terhenti pada keasaman pH 4,2-4,4. Bakteri *Lactobacillus* tumbuh sangat baik pada pH 5,5 dan pertumbuhannya terhenti pada keasaman pH 3-3,8 sedangkan pH optimum perumbuhannya adalah dalam suasana agak asam pH 5,5). Suhu optimum bagi pertumbuhan *S. thermophilus* adalah 37°C dan *L. bulgaricus* 45 °C. Jika kedua bakteri itu diinokulasi pada suhu 45 °C (pH 6,6-6,8), *S. thermophilus* mula-mula tumbuh lebih baik dan setelah pH menurun

karena dihasilkan asam laktat, maka *L. bulgaricus* akan tumbuh lebih baik (Pederson, 1971).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, kaca arloji, spatula besi, pengaduk kaca, botol semprot, corong, kertas saring Whatman No. 41, pipet tetes, kuvet plastik, kuvet kaca, Piala gelas 50; 100; 400 mL, tabung reaksi dan rak, pipet ukur 1; 2; 10 mL, propipet, labu ukur 10; 25; 100 mL, botol cokelat, botol vial, oven, lemari pendingin, pipet mikro 50 μ L, kromatografi gas-spektrometer massa (KG-SM), Spektrofotometer UV-Vis Genesys 10S.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sarang lebah (*Trigona* sp.) yang dibeli dari wisata “Petik Madu” Lawang, Malang, Jawa Timur, metanol, reagen Folin Ciocalteu (Merck), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck), *N*, *O*-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (Sigma Aldrich), asam galat (Sigma-Aldrich), asam sulfat 98% (Smartlab Indonesia), natrium nitrit (Merck), natrium hidroksida (Merck), kuersetin (Sigma-Aldrich), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich), reagen bradford (Sigma-Aldrich), starter yoghurt (Yougurmet), 3-(4-hidroksfenil)-1-propanol, dan aquabides.

3.3 Prosedur

3.3.1 Ekstraksi Propolis

Sampel sarang lebah dipotong menjadi potongan-potongan kecil, dikeringkan dan ditimbang sebanyak 25 g. Kemudian, ditambahkan 250 mL metanol pa dan diaduk menggunakan stirrer selama 60 menit pada suhu 60 °C. Larutan metanol dan sarang lebah kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dan endapan. Endapan dicuci menggunakan metanol pa. Filtrat selanjutnya dievaporasi pada suhu 50 °C selama 75 menit hingga menghasilkan larutan berwarna coklat. Larutan dimasukkan ke dalam lemari pendingin (*freezer*) sampai digunakan untuk prosedur selanjutnya.

3.3.2 Penentuan Kandungan Total Fenolik

Penentuan kandungan total fenolik dilakukan berdasarkan prosedur dari Laskar dkk. (2007). Satu milliliter ekstrak propolis ditambahkan dengan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades dengan perbandingan (1:50). Campuran ini selanjutnya diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu, campuran ditambah dengan 0,2 mL larutan Na_2CO_3 0,4 M. Selanjutnya, campuran diinkubasi di ruang gelap dan suhu ruang selama 2 jam. Setelah 2 jam inkubasi, sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Blanko yang digunakan terdiri dari 0,1 mL pelarut, 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 0,2 mL Na_2CO_3 0,4 M. Standar yang digunakan adalah asam galat dengan variasi konsentrasi 100, 80, 60, 40 dan 20 $\mu\text{g/mL}$. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*). Hasil analisa

kandungan fenolik total dinyatakan dalam satuan μg Asam Galat Ekuivalen (AGE)/g sarang lebah kering.

3.3.3 Penentuan Kandungan Total Flavonoid

Penentuan kandungan flavonoid total dilakukan dengan mencampurkan 0,4 mL dari ekstrak metanol propolis dengan 9,6 mL akuabides, 1,2 mL H_2SO_4 0,2 M dan 1,2 mL NaNO_2 3 M. Selanjutnya ditambah dengan 1,2 mL NaOH 10%. Setelah itu larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap, lalu diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 395 nm. Larutan blanko yang digunakan untuk mengukur sampel ekstrak propolis adalah campuran antara 0,4 mL pelarut; 9,6 mL akuades; 1,2 mL H_2SO_4 0,2 M; 1,2 mL NaNO_2 dan 1,2 mL NaOH 10%. Standar yang digunakan adalah kuersetin dengan variasi konsentrasi 4, 8, 12, 16 dan 20 $\mu\text{g/mL}$. Pengukuran masing-masing ekstrak dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) (Nugraheni, 2013). Hasil analisa kandungan flavonoid total dinyatakan dalam satuan μg Kuersetin Ekuivalen (KE)/g sarang lebah kering.

3.3.4 Penentuan Total Protein Metode Spektroskopi

Penentuan protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (1976). Kuvet yang digunakan adalah kuvet plastik. Satu mililiter ekstrak propolis ditambahkan dengan 0,1 mL akuabides dan 5 mL larutan dye (reagen Bradford). Campuran kemudian didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya absorbansi dari larutan sampel diukur pada panjang gelombang 595 nm. Standar yang digunakan adalah Bovine Serum Albumine (BSA).

3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sebagaimana yang telah dilakukan oleh Campos dkk. (2014). Satu mililiter ekstrak propolis, ditambah dengan 9 mL larutan DPPH 60 μ M. Campuran yang dihasilkan kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm. Pengukuran absorbansi diulangi sebanyak tiga kali. Hasil analisa aktivitas antioksidan dinyatakan dalam bentuk persentase (%) dekolorisasi, yang juga melambangkan % aktivitas penghambatan radikal bebas. Persentase penghambatan dapat dihitung dengan persamaan 3.1.

$$\text{Aktivitas Antioksidan (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}}\right)\right) \times 100\% \quad (3.1)$$

(Nugraheni, 2016)

3.3.6 Pembuatan Yoghurt

Pembuatan yoghurt dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan 4 wadah yang diberi label kontrol, A, B, dan C. Yoghurt dibuat dengan menghangatkan susu pasteurisasi sebanyak 150 mL dalam masing-masing erlenmeyer pada suhu 40-42°C selama 30 menit. Setelah itu, sedikit bagian susu dituangkan ke dalam wadah lain dan dinginkan. Setelah dingin, susu tersebut ditambahkan dengan 1,25 g starter yoghurt dan diinkubasi pada suhu

ruang dan pada akhir inkubasi dicek pH yoghurt sebelum disimpan pada suhu 4 °C.

3.3.7 Fortifikasi Yoghurt

Variasi jumlah ekstrak propolis yang digunakan adalah 40 (A), 80 (B) dan 100 (C) mL. Tiap ekstrak ditambahkan dengan 2 mL aquades steril dan 150 g sampel yoghurt. Selanjutnya, campuran tersebut diaduk secara manual untuk menghindari sineresis. Kontrol yoghurt non-fortifikasi dibuat dengan menambahkan 2 mL aquades steril ke dalam 150 mL yoghurt dan diaduk. Selanjutnya, kontrol dan sampel disimpan dalam suhu 4 °C selama 32 hari. Pada hari ke-3, 6, 10, 14, 21 dan ke-30 dilakukan pengujian pH dan aktivitas antioksidan terhadap kontrol dan sampel.

3.3.8 Analisis KG-SM

Satu mililiter ekstrak propolis kering direaksikan dengan 50 µL 3-(4-hidroksfenil)-1-propanol dan kemudian dievaporasi pada atmosfer nitrogen. Setelah kering, sampel ditambahkan dengan 100 µl BSTFA dan dipanaskan pada suhu 70 °C selama 20 menit (lakukan dalam tabung tertutup). Kemudian, sampel diambil sebanyak 1 µl untuk diinjeksikan ke dalam instrumen KG-SM untuk dianalisis.

Analisa KG-SM dilakukan pada kondisi suhu injeksi 220 °C dan MS *scan range* diatur pada 50-800 Da. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan laju alir 0.7 mL/menit. Suhu kolom awal adalah 100 °C kemudian dinaikkan hingga 310 °C dengan laju kenaikan 5 °C/menit. Setelah itu suhu ditahan selama 8 menit.

Senyawa hasil KG-SM diidentifikasi menggunakan *MS data library* (Kartal et.al, 2002).

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Propolis

Sebelum dilakukan ekstraksi, sarang lebah dikeringkan dan dibersihkan terlebih dahulu dari serpihan kayu dan roti lebah (*bee pollen*). Persentase kadar air yang terdapat dalam sarang lebah adalah 6,46%. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Cunha, dkk. (2004) yang menyebutkan bahwa kadar air dalam sarang lebah berkisar antara 4,6-9,4%.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Perbandingan massa sarang lebah dengan pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah 1:10. Ekstraksi propolis dengan pelarut metanol, menghasilkan ekstrak dengan warna cokelat seperti yang terlihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4. 1 Ekstrak Propolis dengan Pelarut Metanol

4.2 Kandungan Total Fenolik

Pengukuran kandungan total fenolik dilakukan dengan metode kolorimetri, menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) dengan asam galat sebagai senyawa standar. Hasil perhitungan dinyatakan dalam μg Asam Galat Ekuivalen (AGE)/g sarang lebah kering. Hasil pengukuran kandungan total fenolik yang terdapat dalam ekstrak propolis sebesar $45,804 \mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering. Kandungan fenolik dari ekstrak propolis *Trigona* sp. ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Yuliana, dkk., (2013) yang menyatakan kandungan total fenolik pada propolis lebah spesies *Trigona* sp. berkisar antara $39,9 - 97,4 \text{ mg AGE / g}$ sarang lebah dalam pelarut propilen glikol. Hasil ini menunjukkan perbedaan pelarut dapat mempengaruhi kandungan total fenolik. Senyawa-senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak propolis bila dicampur dalam makanan akan diserap namun tidak berubah strukturnya sehingga dapat meningkatkan fungsi dari makanan tersebut sebagai antioksidan (Ostrowska dan Skrzydlewska, 2005).

4.3 Kandungan Total Flavonoid

Pengukuran kandungan total flavonoid dilakukan dengan metode kolorimetri, menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) dengan kuersetin sebagai senyawa standar. Hasil perhitungan dinyatakan dalam mg Kuersetin Ekuivalen (KE)/kg sarang lebah kering. Hasil analisis kandungan total flavonoid sebesar $6,593 \pm 0,019 \mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering. Hasil ini lebih rendah

dibandingkan dengan hasil penelitian Yuliana, dkk., (2013) yang menyatakan kandungan total flavonoid pada propolis lebah spesies *Trigona* sp. berkisar antara 3,12 – 20,22 mg KE / g sarang lebah dalam pelarut propilen glikol. Hasil ini menunjukkan perbedaan pelarut dapat mempengaruhi kandungan total flavonoid. Senyawa flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan karena memiliki peran yang penting dalam metabolisme oksigen serta menghambat reaksi radikal lemak bebas (Ostrowska dan Skrzydlewska, 2005).

4.4 Penentuan Kadar Protein dalam Ekstrak Propolis

Komposisi kimia propolis sangat kompleks. Kurang lebih terdapat 200 kandungan yang telah diteliti seperti asam benzoat dan ester-ester, asam fenolat tersubstitusi, flavonoid, terpen, steroid, enzim, dan asam amino terkonjugasi. (Greenaway, dkk., 1990). Hasil analisis kandungan protein yang diperoleh dalam ekstrak propolis adalah sebesar 24,931 µg Bovine Serum Albumin (BSA) Ekuivalen/g sarang lebah kering. Penelitian lain yang mengukur kandungan protein (asam amino) pernah dilakukan oleh Marcucci, dkk. (1996). Dalam penelitian tersebut dilaporkan terdapat 13,56-87,04 µg asam amino bebas /g sarang lebah dalam Brazilian propolis dari sarang lebah *Apis mellifera* yang dihidrolisis dalam HCl 6 N. Menurut Ghisalberti (1979) kandungan asam amino dalam protein propolis yang paling besar adalah *arginine* dan *proline* yang diketahui terkandung sebanyak 50%. Kandungan protein dalam ekstrak propolis dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan nilai gizi makanan yang akan difortifikasi.

4.5 Aktivitas Antioksidan Propolis

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul tidak stabil yang disebut sebagai radikal bebas (Sies, 1997). Aktivitas antioksidan disajikan dalam bentuk persentase dekolorisasi (%), dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Senyawa radikal yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Senyawa DPPH mempunyai absorbansi maksimum pada rentang panjang gelombang 515-520 nm (Martysiak-Żurowska dan Went, 2012). Pada penelitian ini pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 517 nm, sebagaimana yang dilakukan oleh Campos (2014). Dalam penelitian ini pengukuran persentase dekolorisasi dilakukan pada konsentrasi 100%, dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan kondisi optimum untuk mengukur persentase dekolorisasi dari ekstrak propolis, sebagaimana yang telah dilakukan oleh Nugraheni, dkk. (2016). Hasil yang diperoleh dari persen dekolorisasi yaitu 82,655%. Nilai persentase dekolorisasi dari ekstrak propolis *Trigona* sp., yang diperoleh lebih kecil dibandingkan dengan penelitian Hariyanto, dkk., (2017) yang melaporkan aktivitas antioksidan pada propolis *Trigona* sp. dengan pelarut metanol sebesar 90,697% dengan kandungan total fenolik sebesar $498,925 \pm 6,322 \mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering dan kandungan total flavonoid sebesar $129,265 \pm 2,166 \mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering. Perbedaan hasil ini dimungkinkan karena adanya perbedaan proses ekstraksi karena dalam penelitian tersebut dilakukan maserasi selama 7 hari sedangkan pada

penelitian ini maserasi dilakukan selama 30 menit. Dari hasil penelitian dapat dilihat bahwa semakin tinggi kandungan total fenolik dan flavonoid dalam ekstrak propolis maka aktivitas antioksidan yang dihasilkan juga semakin tinggi. Aktivitas antioksidan yang tinggi dapat mengurangi resiko terkena penyakit yang disebabkan oleh penuaan sel seperti Parkinson atau Alzheimer (Czecczot, 2000).

4.6 Fortifikasi Yoghurt

4.6.1 Pembuatan Yoghurt

Pada proses pembuatan yoghurt, susu pasteurisasi komersial dihangatkan hingga suhu 40-42 °C selama 30 menit kemudian ditambahkan biakan yoghurt yang berisi *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan diinkubasi pada suhu ruang. Setelah 8 jam inkubasi diperoleh yoghurt dengan tekstur yang lebih kental dengan nilai pH yang dapat dilihat pada Tabel 4.1. Besarnya pH yang tidak sama dalam yoghurt dipengaruhi oleh jumlah asam laktat yang terbentuk saat proses inokulasi. Adapun hasil inkubasi yoghurt setelah 24 jam dapat dilihat pada Gambar 4.2. Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa yoghurt bertekstur kental.



Gambar 4. 2 Kondisi yoghurt 24 jam inkubasi

Tabel 4. 1 Tabel Pengamatan pH Yoghurt Hari ke-1 sampai ke-30

Nama Ekstrak	pH Hari Ke-						
	1	3	6	10	14	21	30
kontrol	5	5	4	4	4	4	4
EpMe + A	5	5	4	4	4	5	5
EpMe + B	5	5	4	4	4	5	5
EpMe + C	5	5	4	4	4	5	5

4.6.2 Penambahan Ekstrak Propolis ke Dalam Yoghurt

Tujuan penambahan ekstrak propolis ke dalam yoghurt adalah untuk meningkatkan nilai gizi dan fungsi dari yoghurt. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran derajat keasaman (pH) untuk melihat kualitas yoghurt apakah masih layak atau tidak. Derajat keasaman (pH) yoghurt dipengaruhi oleh jumlah asam laktat yang terbentuk saat proses inokulasi. Derajat keasaman yoghurt pada hari ke-1 sampai ke-30 yang diperoleh berkisar antara 4-6 (Tabel 4.1), sedangkan pH awal propolis adalah 5. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Allgeyer (2010) yang menyebutkan bahwa pH yoghurt berada pada rentang 4,3-4,4. Pada penelitian ini, aktivitas antibakterial tidak membuat bakteri benar-benar mati yang dibuktikan dengan adanya aktivitas penurunan pH dari hari inkubasi pertama sampai hari ke-21 untuk campuran A, B, dan C. Setelah itu pH berangsur naik dimungkinkan karena yoghurt sudah rusak. Yoghurt dianggap rusak bila menunjukkan penyimpangan konsistensi serta tekstur dari keadaan yang normal. Yoghurt yang normal mempunyai konsistensi kental sehingga bila keadaannya menjadi encer maka hal

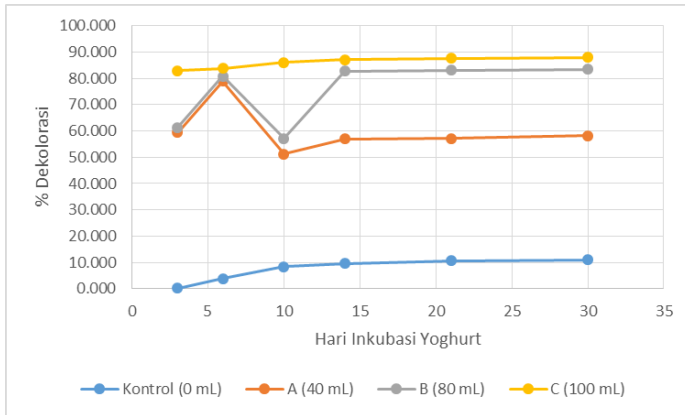
ini merupakan suatu tanda kerusakan (Winarno, dkk., 1981). Umumnya kerusakan pada produk yoghurt adalah terjadinya penyimpangan pH, bau busuk, timbulnya *whely* serta timbulnya gas.

4.6.3 Aktivitas Antioksidan Yoghurt

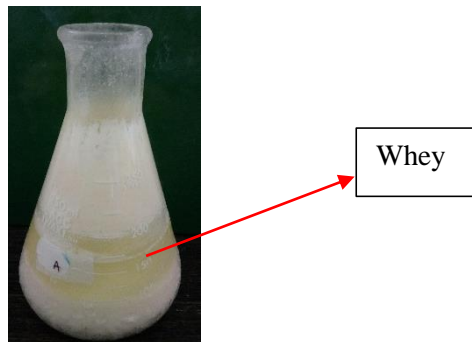
Propolis saat ini digunakan sebagai bahan permen, biofarma, dan penyusun kosmetik. Propolis dikenal sebagai pengawet makanan dan sumber senyawa bioaktif untuk makanan dan minuman yang dapat menambah waktu penyimpanan dan kesehatan konsumen yang mempunyai aktivitas biologis yang tinggi (Duman dan Özpolat, 2015). Hasil penentuan aktivitas antioksidan pada penelitian ini yang dinyatakan dengan % dekolorisasi pada yoghurt kontrol, A, B, dan C (Tabel 4.2). Grafik hubungan % dekolorisasi dengan hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Tabel 4. 2 Tabel % Dekolorisasi Yoghurt A, B, dan C

mL penambahan EpMe	% Dekolorisasi Hari Ke-					
	3	6	10	14	21	30
0 (kontrol)	0.092	3.756	8.333	9.499	10.583	10.924
40 (A)	59.504	78.932	51.304	56.991	57.161	58.177
80 (B)	61.295	80.810	57.174	82.713	83.080	83.521
100 (C)	82.920	83.803	86.087	87.080	87.576	87.953



Gambar 4. 3 Grafik Hubungan % Dekolorisasi dengan Hari Inkubasi



Gambar 4. 4 Timbulnya Whey pada Yoghurt

Berdasarkan Gambar 4.3, dapat dilihat bahwa untuk yoghurt kontrol dan C (penambahan ekstrak propolis 100 mL) memiliki kecenderungan untuk memiliki % dekolorisasi yang meningkat dari hari ke-3 hingga 30. Sedangkan untuk yoghurt A (penambahan ekstrak propolis 40 mL) dan B (penambahan ekstrak propolis 80 mL) %

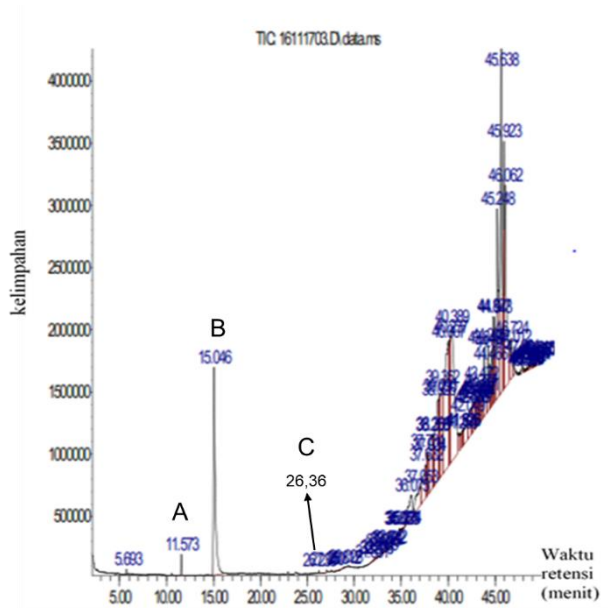
dekolorisasinya meningkat dari hari ke-3 ke-6, kemudian mengalami penurunan pada hari ke-10 dan kembali meningkat di hari ke-14, 21, dan 30. Hal ini kemungkinan dikarenakan pertumbuhan bakteri telah selesai dan menyisakan asam laktat yang dibuktikan dengan pH yang masih cenderung asam yaitu di bawah 7 dan di bawah pH susu hasil pengamatan. Hasil % dekolorisasi yang meningkat setelah hari ke-14 dimungkinkan karena terjadi kerusakan yoghurt yaitu timbulnya *whey*, yaitu cairan kuning kehijauan yang terpisah dari yoghurt (Gambar 4.4) (Helferich & Westhoff, 1980). Pada yoghurt C dengan penambahan 100 mL ekstrak propolis, masa penyimpanan ekstrak propolis bertambah dan % dekolorisasinya meningkat dari hari ke-1 sampai ke-30 sehingga penambahan ekstrak propolis sebanyak 100 mL adalah yang paling optimum.

4.7 Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa

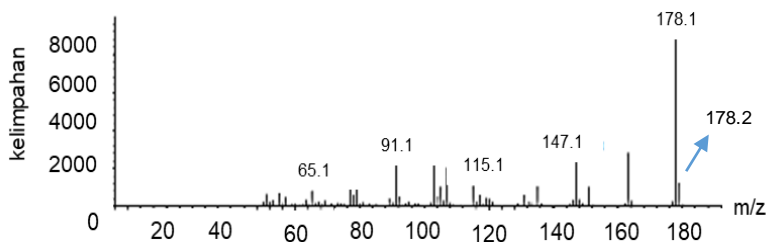
Karakterisasi menggunakan KG-SM bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak propolis. Kromatogram hasil KG-SM dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Dari kromatogram tersebut, didapati puncak metabolit A pada waktu retensi 11,536 menit. Senyawa tersebut memiliki m/z 178,1 g/mol dimana spektranya dapat dilihat pada Gambar 4.6. Dari gambar 4.6 setelah dibandingkan dengan referensi dari *database* dimungkinkan terdapat senyawa 1,2 dimetoksi-4-(2-propenil)benzena (Gambar 4.7). Penelitian Deng, dkk., (2010) menyebutkan bahwa senyawa ini terdapat pada *Acorus tatarinowii* yaitu tanaman

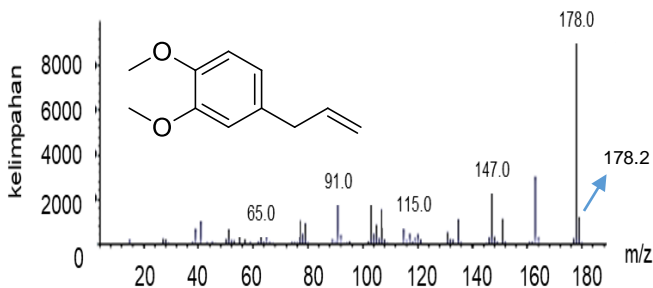
pengobatan tradisional Cina dan memiliki bioaktivitas sebagai antijamur.



Gambar 4. 5 Kromatogram KG

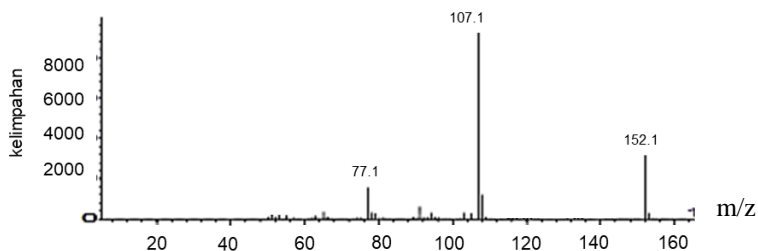


Gambar 4. 6 Spektra massa metabolit A dengan m/z 178,2 g/mol

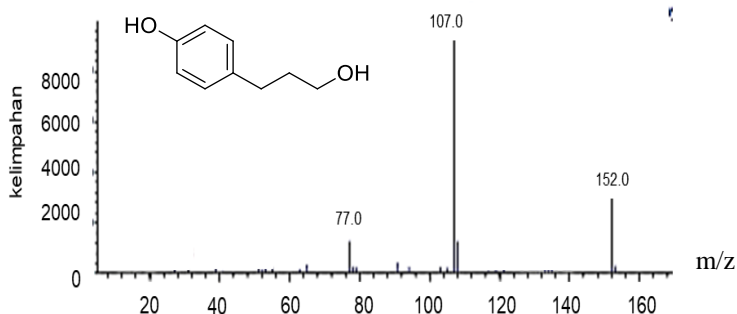


Gambar 4. 7 Spektra massa 1,2 dimetoksi-4-(2-propenil)benzena dari *database*

Selanjutnya pada waktu retensi 15,046 menit terdapat puncak yang memiliki m/z 152 g/mol (Gambar 4.8) yang setelah dibandingkan dengan referensi dari *database* (Gambar 4.9) menunjukkan kemungkinan adanya senyawa 3-(4-hidroksifenil)-1-propanol. Menurut penelitian Rasooli (2011), senyawa ini terdapat dalam tanaman genus *Zanthoxylum* yang memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan, antibakterial, antitumor dan antivirus.

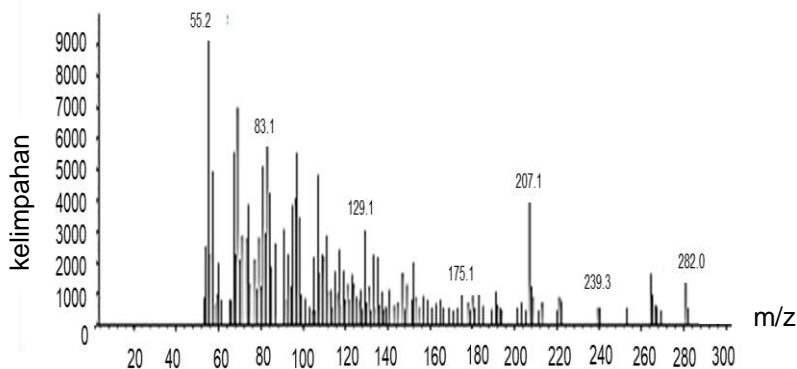


Gambar 4. 8 Spektra Massa Metabolit B dengan m/z 152,1 g/mol

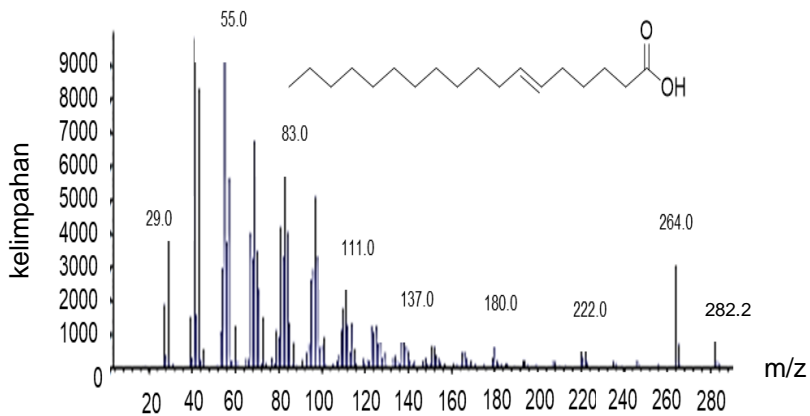


Gambar 4. 9 Spektra massa 3-(4-hidroksifenil)-1-propanol dari *database*

Selanjutnya didapat puncak metabolit C pada waktu retensi 26,236 menit. Senyawa tersebut memiliki m/z 282 g/mol dimana spektranya dapat dilihat pada Gambar 4.6. Dari gambar 4.6 setelah dibandingkan dengan referensi dari *database* dimungkinkan terdapat senyawa (Z)- Asam 6-Oktadekenoat (Gambar 4.7). Penelitian Alaluf, dkk. (2010) menyebutkan bahwa senyawa ini dapat digunakan dalam formulasi kosmetik sebagai agen pelembab dan penghambat penuaan dini.



Gambar 4. 10 Spektra Massa senyawa Metabolit C dengan m/z 282 g/mol



Gambar 4. 11 Spektra massa (Z)- Asam 6-Oktadekenoat dari *database*

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini telah dilakukan ekstraksi propolis dari sarang lebah *Trigona* sp. menggunakan pelarut metanol untuk mengetahui kandungan total fenolik, flavonoid, dan protein, serta aktivitas antioksidan yang terdapat dalam ekstrak propolis. Kandungan total fenolik yang diperoleh sebesar $45,804 \pm 0,511 \mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering. Kandungan total flavonoid dalam ekstrak propolis sebesar $6,582 \pm 0,019 \mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering. Kandungan total protein dalam ekstrak propolis adalah sebesar $24,931 \mu\text{g BSA/g}$ sarang lebah kering. Sedangkan aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH yang diperoleh adalah 82,655%. Pada analisis menggunakan KG-SM dapat diketahui kandungan senyawa dalam ekstrak propolis yaitu 1,2 dimetoksi-4-(2-propenil)benzena, 3-(4-hidroksifenil)-1-propanol, dan (Z)-Asam 6-Oktadekenoat. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak propolis pada yoghurt dapat meningkatkan nilai gizi dengan meningkatkan aktivitas antioksidannya.

5.2 Saran

Penelitian terhadap aktivitas antioksidan dari propolis *Trigona* sp., dari Lawang, Jawa Timur masih belum sempurna. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap komposisi senyawa-senyawa dalam propolis. Selanjutnya, diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih

lanjut mengenai aktivitas biologis lainnya dari propolis *Trigona* sp. di Indonesia, seperti aktivitas antibakteri, antikanker, antipembengkakan dan sebagainya. Selain itu pengolahan lebih lanjut terhadap propolis *Trigona* sp., hingga dapat dikonsumsi oleh masyarakat sebagai alternatif pengobatan secara alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Administration, T. U. F. a. D., 2014. *The U.S Food and Drug Administration*. [Online]
Available at: www.fda.gov
[Accessed 20 December 2017].
- Ahumada, C., Saenz, T., Garcia, D., de la Puerta, Rocio et al., 1997. The effects of triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on differen acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospolipase A2 inhibition. *J Pharm Pharmacol*, 49(3), pp. 329-331.
- Alaluf, S., 2010. *Kosmetische Verwendung von Petroselinssäure*. Rotterdam, Nethserland, Patent No. 0001013178.
- Alimentarius, C., 1976. Codex Standard for Flavoured Yoghurt (Yogurt) and Products Heat-Treated After Fermentation. *Codex Stan*, Issue A-11 (b).
- Allgeyer, L. C., Miller, M. J. & Lee, S. Y., 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J. Dairy Sci.*, Issue 93, pp. 4471-4479.
- Astawan, M., 2008. *Susu Fermentasi untuk Kebugaran dan Pengobatan*. Yogyakarta: Universitas Atma Jaya.
- Bankova, V., 1992. Original Article Propolis Produced in Bulgaria and Mongolia ; Phenolic Compounds and Plant Origin. *Apidologic*, Volume 23, pp. 79-85.
- Bankova, V., 2005a. Chemical Diversity of Propolis and the Problem of Standardization. *J. Etnopharma*, Volume 100, pp. 114-117.
- Bankova, V., 2005b. Recent Trends and Important Developments in Propolis Research. *Evid-Based*

- Complement. Altern. Med*, Volume ECAM 2, pp. 29-32.
- Bankova, V., 2005. Recent Trends and Important Development in Propolis Research. *Evid-Based Complement Altern. Med.*, pp. 29-32.
- Burdock, G. A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol*, 4(36), pp. 347-363.
- Campos, J., dos Santos, U., Macorini, L., Mestriner, A. Balestieri, J., Gamero, E., Cardoso, C., Souza, K. dos Santos, E., 2014. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.*, Issue 65, pp. 374-380.
- Carmona-Jiménez, Y., Garcia-Moreno, M. V., Igartuburu, J. M. & Barroso, C. G., 2014. Simplification of The DPPH Assay for Estimating The Antioxidant Activity of Wine and Wine By-Products. *Food Chem*, Volume 165, pp. 198-204.
- Chandra, J. H. & Gunasekaran, H., 2017. Screening of phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Journal of Environmental Biology*, 38(1), pp. 161-165.
- Cunha, I., Sawaya, A. Carvalho, P., 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem*, pp. 964-970.
- Czecczot, H., 2000. Flavonoidy-naturalne antyoksydanty w naszej diecie [in Polish]. *Zyw. Czlow. Metab.*, Volume 27, pp. 372-382.
- Deng, Y., Chen, K. L., Yu, C., Deng, Z., .et al., 2010. In Vitro Antifungal Activity of the Extract and compound from *Acorus tatarinowii* Against Seven Plant Pathogenic Fungi. *Agricultural Sciences in China*, 9(1), pp. 71-76.

- Dobrowolski, JW., Vohora, SB., Sharma, K., Shah, SA., Naqvi, SA., Dandiya, PC., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol*, Issue 35, pp. 77-82.
- Duman, M. & Özpolat, E., 2015. Effect of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. *Food Chemistry*, Issue 189, pp. 80-85.
- Ghiralverti, E., 1979. Propolis : a review. *Bee World*, Issue 60, pp. 59-84.
- Ghisalberti, E. L., 1979. *Bee World*, Issue 60, pp. 59-84.
- Ginting, N. & Pasaribu, E., 2005. Pengaruh temperatur dalam pembuatan yoghurt dari berbagai jenis susu dengan menggunakan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. *Jurnal Agribisnis Peternakan*, 1(2).
- Gjorgievski, N. et al., 2015. Determination of Antioxidant Activity in Yogurt. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, pp. 88-91.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T. & Whatley, F. R., 1990. The composition and plant origins of plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, Issue 71, pp. 107-118.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G. & Rakesh, D. D., 2008. Extractio Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *ICS-UNIDO*.
- Harborne, J. B. & Williams, C. A., 2000. Advances in Flavonoid Research. *Phytochemistry*, Volume 55, pp. 481-504.
- Hariyanto, R. A. B., Wahyudi, A. & Nugraheni, Z. V., 2017. Penentuan Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Propolis *Trigona* sp.. *Jurnal Sains dan Seni POMITS*.

- Havsteen, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol*, Issue 32, pp. 1141-1148.
- Helferich, W. & Westhoff, D., 1980. *All about yoghurt prentice-Hall*. New Jersey: Mc. Engel Wood-Cliffs.
- Helferich, W. & Wishoff, D. C., 1978. *Food Microbiology*. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill Book Company.
- Hendayana, 2006. *Kimia Pemisahan : Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern, edisi pertama*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hidayati, M. D., 2015. Pemisahan dan Identifikasi Antioksidan, Inhibitor α -Glukosidase dan Aldosa Reduktase dari Daun Salam (*Syzygium Polyanthum* Wight).
- Hidayat, I. R., 2013. Total bakteri asam laktat, nilai pH dan sifat organoleptik drink yoghurt dari susu sapi yang diperkaya dengan ekstrak buah mangga. *Animal Agriculture Journal*, 2(1), pp. 160-167.
- Hosni, K. et al., 2010. Volatile Oil Constituents of *Rosa canina* L. : Quality As Affected by the Distillation Method. *Organic Chemistry International*, Volume 2010.
- Huang, S. et al., 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Mol. Basel. Switz*, Volume 19, pp. 19610-19632.
- Kamara, D. S. et al., 2016. Pembuatan dan Aktivitas Antibakteri Yogurt Hasil Fermentasi Tiga Bakteri (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*). *Al-Kimia*, 4(2), pp. 22-32.
- Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S., 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* 2, pp. 41-60.

- Kohlmunzer, S., 2003. *Farmakognozja*. 5th ed. Warszawa, Poland: PWN.
- Leja, M. et al., 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem*, Issue 100, pp. 237-240.
- Majewska, M. & Cieczot, H., 2009. Flavonoids in Prevention and Therapy of Diseases. *Farm Pol*, Volume 65, pp. 369-377.
- Majiene, D., Trumbeckaite, S., Pavilonis, A., Savickas, A., Martirosyan, D. M., 2007. Antifungal and Antibacterial Activity of Propolis. *Current Nutr. Food Sci*, Volume 3, pp. 304-308.
- Makowska-Was, J. & Janeczko, Z., 2004. Bioavailability of plant polyphenols. *Post. Fitoter*, Volume 4, pp. 126-137.
- Marcucci, M. C., 1995. Propolis : chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Issue 26, pp. 83-99.
- Martysiak-Żurowska, D. & Wenta, W., 2012. A Comparison of ABTS and DPPH Methods for Assessing The Total Antioxidant Capacity of Human Milk. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, Issue 11, pp. 83-85.
- McLean, V., 1982. Fermented dairy products. In: G. Reed, ed. *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*. Westport: AVI Publishing Co, pp. 113-184.
- McNair, H. M., 2009. *Basic Gas Chromatography*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Meda, A. et al., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid, and proline content in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chemistry*, Issue 91, pp. 571-577.
- Mishima, S., Inoh, Y., Narita, Y., Ohta, S., Sakamoto, T., Araki, Y., Suzuki, K. M., Akao, Y., Nozawa, Y.,

2005. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of HL-60 cells. *Bioorg. Med. Chem.* Issue 13, pp. 5814-5818.
- Mulja, M. & Suharman, 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Mulja, M. & Syahrani, A., 1990. *Aplikasi Analisis Spektrofotometri UV-Vis*. Surabaya: Mechpiso Grafika.
- Nugraheni, Z. Zetra, Yulfi. Trianita, Aldila Mega. Syahputra, Muhammad Yudha. Firmany, Ahmad Rizal, 2016. Antioxidant activity in natural beehive's (Apis mellifera) bioactive compound from Malang, Indonesia. *Presented at the INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CURRENT PROGRESS IN MATHEMATICS AND SCIENCES 2015 (ISCPMS 2015): Proceedings of the 1st International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences, AIP Publishing*, p. 20053.
- Ostrowska, J. & Skrzydlewska, E., 2005. The biological activity of flavonoids. *Post. Fitoter*, pp. 71-79.
- Paulino, N., Dantas, A. P., Bankova, V. Longhi, D. T., Scremin, A., de Castro, S. L., Calixto, J. B., 2003. Bulgarian Propolis Induces Analgesic and Anti-inflammatory Effects in Mice and Inhibits in vitro Contraction of Airway Smooth Muscle. *J. Pharm. Sci.* Volume 92, pp. 307-313.
- Pederson, C., 1971. *Microbiology of Feed Fermentation*. West Port: The AVI Pul. Co. Inc..
- Peschel, W., Rabaneda, F. S., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., Codina, C., 2006. Natural Antioxidants from Vegetables and Fruit Wastes. 137-150(97).

- Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod*, Volume 63, pp. 1035-1042.
- Prakash, A., Rigelhof, F. & Miller, E., 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Lab Anal. Prog.*, Volume 19, pp. 1-4.
- Rasooli, I., 2011. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. Croatia: s.n.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med*, Issue 20, pp. 933-956.
- Rouessac, F. & Rouessac, A., 1994. *Chemical Analysis Modern Instrumentation Method and Techniques*. 2nd ed. USA: John Willey & Sons.
- Sanders, M., 1999. Probiotics. *Food Technol*, Issue 53, pp. 67-77.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K.H., Reichling, J., 2010. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytother Res.*, Volume 24, pp. 20-28.
- Sforcin, J. M., 2016. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytoter. Res PTR*, Issue 30, pp. 894-905.
- Sheela, V. & Uthayakumari, F., 2013. GC-MS analysis of bioactive constituents from coastal sand dune taxon - *Sesuvimportulacastrum* (L.). *BiosciDiscov*, Issue 4, pp. 47-53.
- Silva, C. R., Baltazar, F. & Almeida-Aguiar, C., 2015. Propolis : A Complex Natural Product With A Plethora of Biological Activities that can be Explored for Drug Development. *Evid Based Comp. Alter. Med*, pp. 1-30.
- Silva, J. C., Rodrigues, S., Feas, X. & Estevinho, L. M., 2012. Antimicrobial Activity, Phenolic Profile

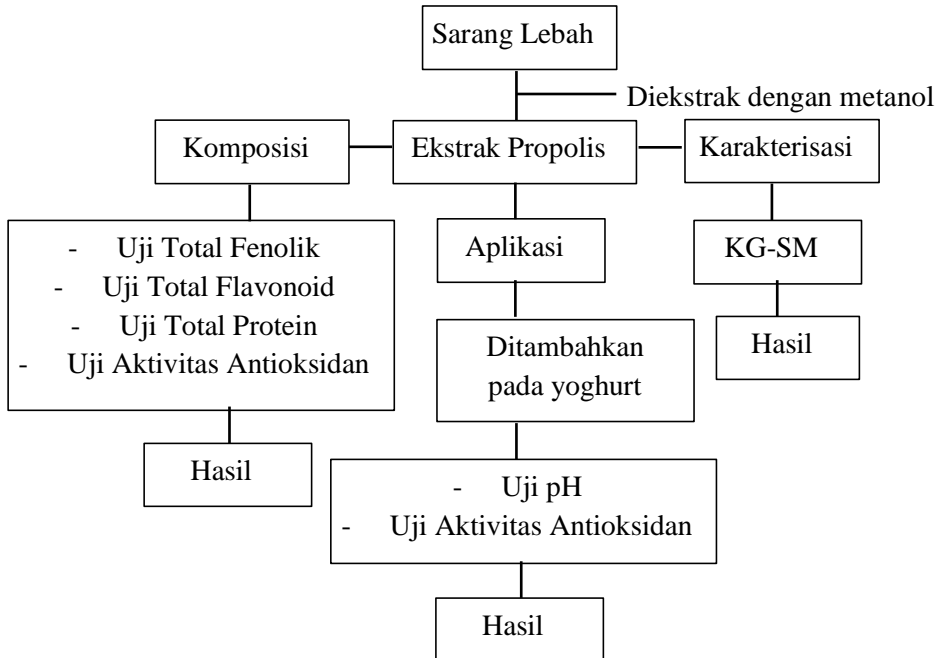
- and Role in the Inflammation of Propolis. *Food Chem Tox.*, Volume 50, pp. 1790-1795.
- Solomon, T. W. G., 1976. *Organic Chemistry*. 2nd ed. USA: John Willey & Sons.
- Sulaiman, G. M. et al., 2011. Chemical Characterization of Iraqi Propolis Samples and Assessing their Antioxidant Properties. *Food Chem Tox*, Volume 49, pp. 2415-2421.
- Sultana, B., Anwar, F. & Ashraf, M., 2009. Effect of Extraction of Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts Molecules. Issue 14, pp. 2167-2180.
- Tamat, S. R., Wikanta, T. & Maulina, L. S., 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dan Ekstrak Rumput Laut Hijau Ulva reticulata Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(1), pp. 31-36.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. & Kakde, R. B., 2008. Flavonoids as nutraceuticals : A review. *Trop. J. Pharm. Res*, Issue 65, pp. 1089-1099.
- Thirugnanasampandan, R., Sayana, B. R. & Jayakumar, R., 2012. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. *Asia Pasific Journal of Tropical Biomedicine*, pp. 651-654.
- Valencia, D. Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Juan, C., Galvez-Ruiz, Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Hernandez, J., Velazquez, C., 2012. Seasonal Effect on Chemical Composition and Biological Activities of Sonoran Propolis. *Food Chem*, Volume 131, pp. 645-651.
- Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, FM., Velazquez, E. F.,

- Astiazaran, H., Hernandez, J., 2007. Antibacterial and Free Radical Scavenging Activities of Sonora Propolis. *J. Appl. Microbial*, Volume 103, pp. 1747-1756.
- Viera, V. B., Piovesan, N. Moro, K. I. B., Rodrigues, A. S., Scapin, G., da Rosa, C. S., Kubota, E. H., 2016. Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. *Food Sci. Tech.*, 36(1), pp. 37-41.
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J. & Sforcin, J. M., 2011. Cytotoxic Constituents of Propolis Inducing Anticancer Effects : A Review. *J. Pharm. Pharmacol*, Volume 63, pp. 1378-1386.
- Winarno, F. G., Fardiaz, S. & Fardiaz, D., 1981. *Pengantar Teknologi Pangan*. 2 ed. Jakarta: PT. Gramedia.
- Yuliana, N. D., Wijaya, C. H. & Nasrullah, N., 2013. *Classification of Trigona sp. bee propolis from 4 regions in Indonesia using FTIR metabolomics approach*. Singapore, 13th ASEAN Food Conference.

" Halaman ini sengaja dikosongkan"

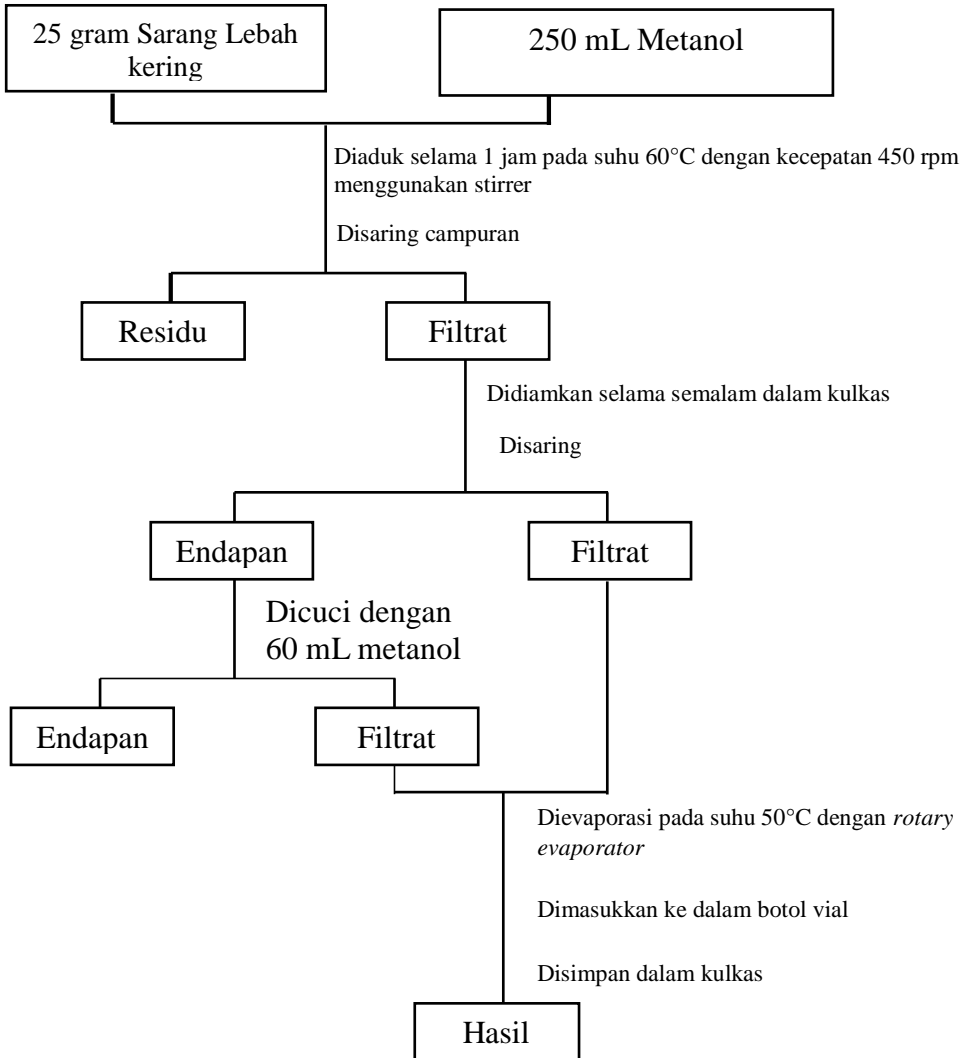
LAMPIRAN

A. Skema Kerja

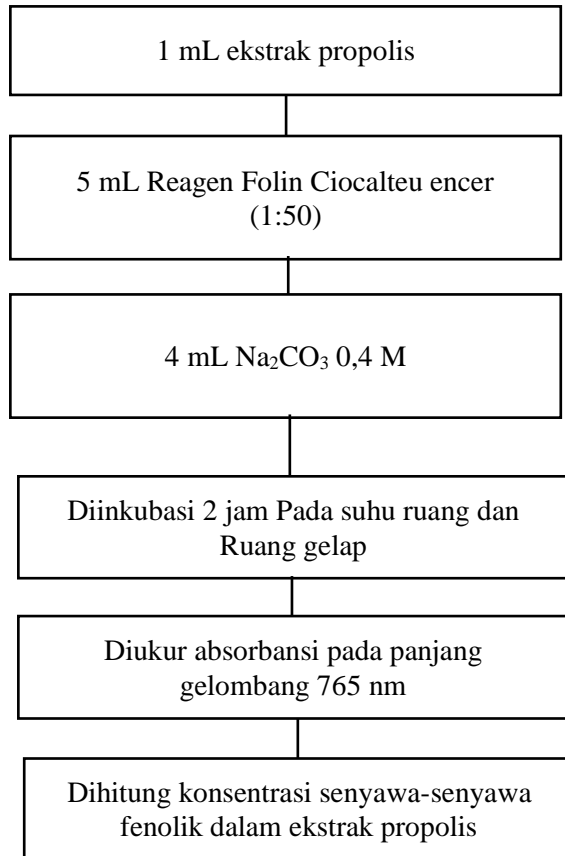


B. Diagram Alir

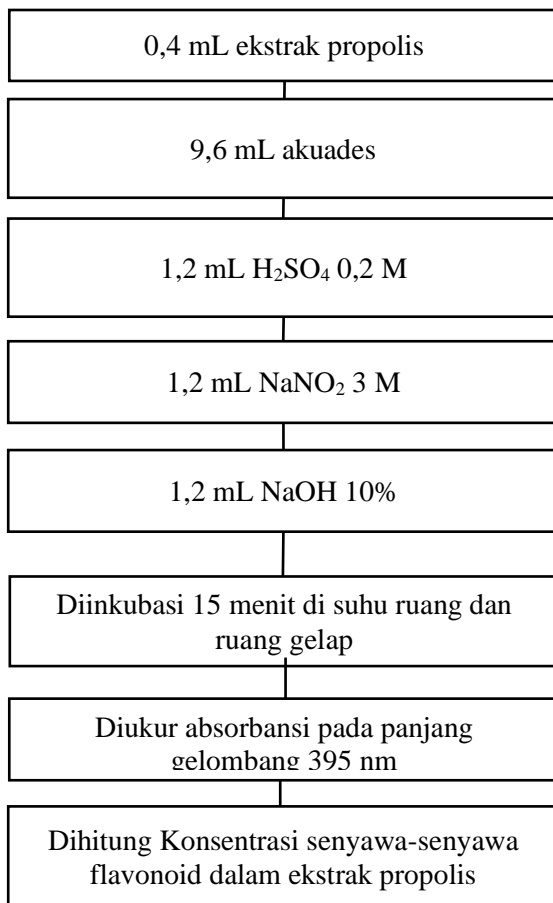
1. Ekstraksi Propolis



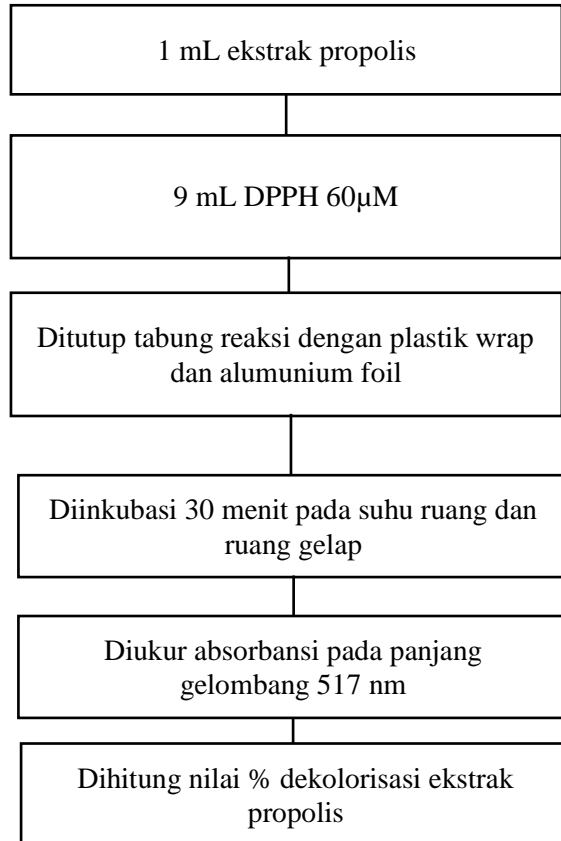
2. Analisa Total Kandungan Fenolik



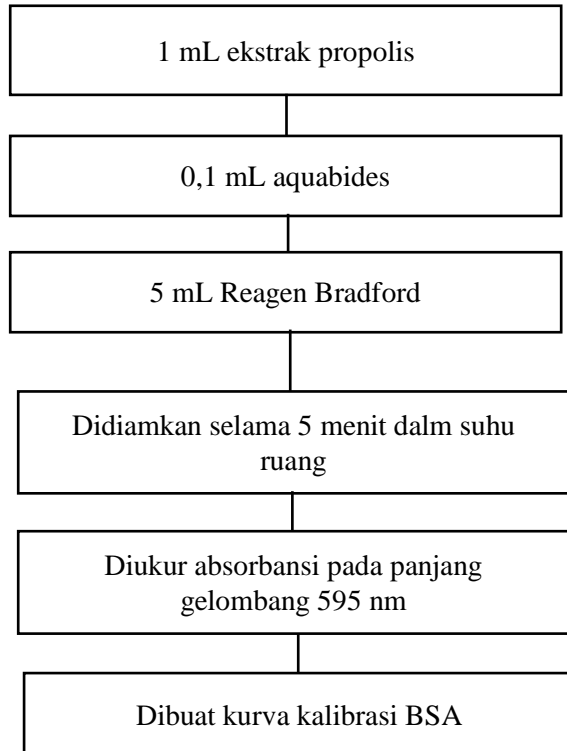
3. Analisa Total Kandungan Flavonoid



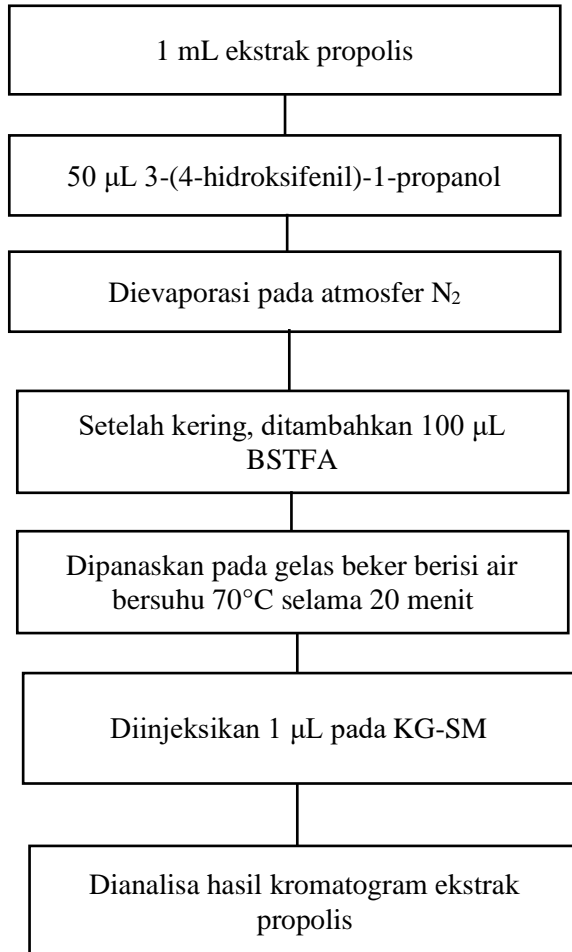
4. Analisa Aktivitas Antioksidan



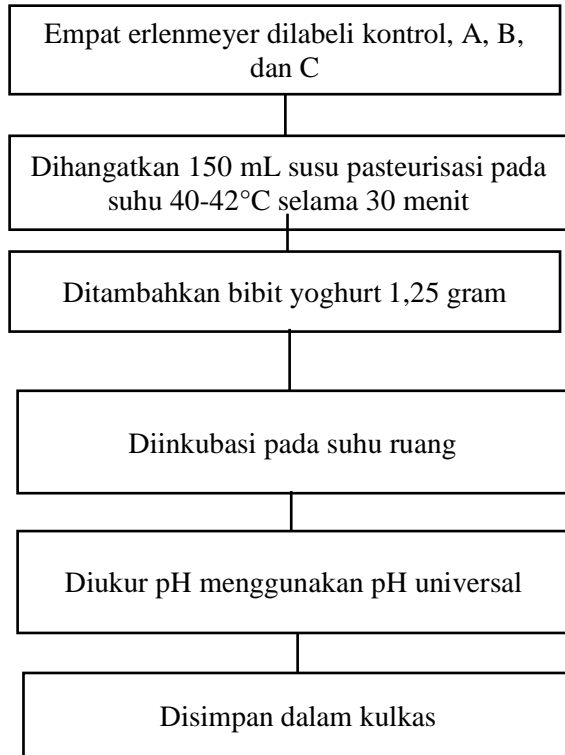
5. Analisa Total Protein



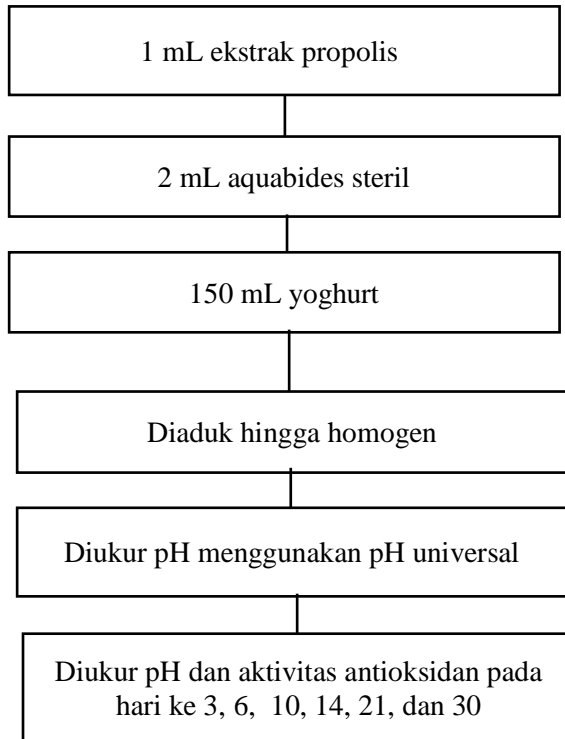
6. Analisa dengan KG-SM



7. Pembuatan Yoghurt



8. Fortifikasi Yoghurt



C. Data dan Perhitungan

1. Ekstraksi Propolis

- Perhitungan (%) Kadar air

Diketahui: Massa Kaca Arloji (MKA) = 27,4087 g

Massa Sarang Lebah Awal (MSL_0) = 0,7533 g

Massa Sarang Lebah Akhir (MSL_1) = 0,7046 g

$$\begin{aligned}(\%) \text{ Kandungan Air} &= \frac{MSL_0 - MSL_1}{MSL_0} \times 100\% \\&= \frac{0,7533 \text{ g} - 0,7046 \text{ g}}{0,7533 \text{ g}} \times 100\% \\&= \frac{0,0487 \text{ g}}{0,7533 \text{ g}} \times 100\% \\&= 0,0646 \times 100\% \\&= 6,46 \%\end{aligned}$$

2. Analisa Total Kandungan Fenolik

- Perhitungan Pembuatan Larutan Na_2CO_3 0,4 M

$$\begin{aligned}m &= n \times Mr \\&= M \times V \times Mr \\&= 0,4 \times 0,1 \times 105,99 \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \text{L} \times \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \\&= 4,2396 \text{ gram}\end{aligned}$$

*Keterangan: m: massa; Mr: Massa molekul relatif; V: Volume H_2O

a. Pembuatan larutan stok Asam Galat 100 ppm

$$100 \text{ ppm} = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 10^{-4} \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 10^{-2} \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Jadi pembuatan larutan stok asam galat dilakukan dengan melarutkan 0,01 g asam galat dalam beberapa mL pelarut, lalu diencerkan kembali hingga tanda batas labu ukur 100 mL.

b. Pengenceran larutan stok asam galat 100 ppm menjadi konsentrasi 80,60,40 dan 20 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 80 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,02 \text{ L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 60 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,015 \text{ L} \end{aligned}$$

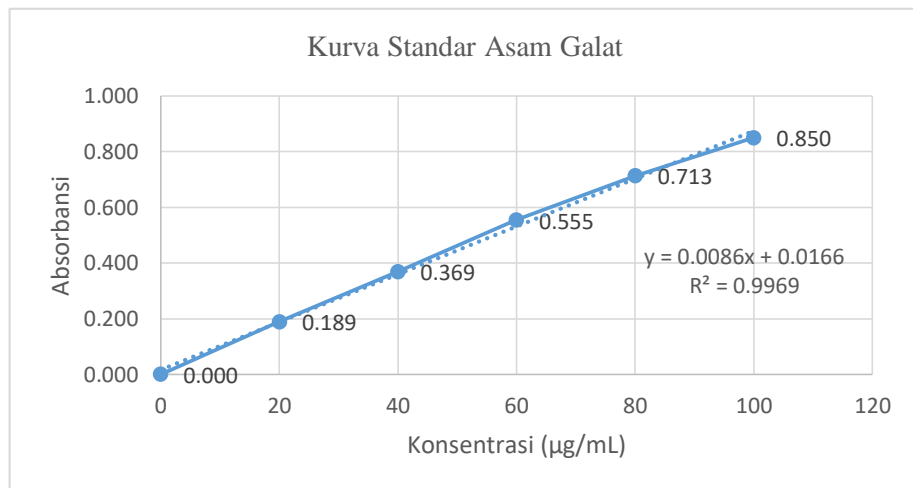
$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 40 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,010 \text{ L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 20 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,005 \text{ L} \end{aligned}$$

*Keterangan: V_1 : Volume larutan stok; V_2 : Volume pelarut; M_1 : Konsentrasi larutan stok; M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

- Kurva Standar dan Total Kandungan Fenolik

Data Absorbansi Kurva Standar Asam Galat Ekstrak Propolis dalam Pelarut Metanol				
Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi Ke			Absorbansi rata rata
	1	2	3	
0	0	0	0	0,000
20	0,188	0,188	0,190	0,189
40	0,369	0,369	0,369	0,369
60	0,552	0,556	0,556	0,555
80	0,711	0,712	0,716	0,713
100	0,850	0,851	0,850	0,850



Nama Ekstrak	Absorbansi Ke			Absorbansi rata rata	SD
	1	2	3		
EPMe	0,595	0,585	0,597	0,592	0,006

Konsentrasi (µg/mL)			Konsentrasi rata-rata	SD
1	2	3		
67,256	66,093	67,488	66,946	0,748

SLK (g)	FP	V (mL)	Total Kandungan Fenolik (TKF)			Rata-Rata	SD	TKF Akhir (µg/g)
			1	2	3			
23,385	16	1	46,016	45,221	46,175	45,804	0,511	45,804 ± 0,511

Contoh Perhitungan Total Kandungan Fenolik

$$\begin{aligned}
 \text{TKF} &= C \times V \times \text{FP} \times \frac{1}{\text{SLK}} \\
 \text{TKF} &= 67,256 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL} \times 16 \times \frac{1}{23,385 \text{ g}} \\
 &= 46,016 \mu\text{g/g}
 \end{aligned}$$

Keterangan: C=Konsentrasi sampel yang didapat dari perhitungan persamaan regresi linier; V= Volume Ekstrak yang digunakan; FP= Faktor pengenceran; SLK= Sarang Lebah Kering; SD= Standar Deviasi; EPMe= Ekstrak Propolis Metanol

3. Analisa Total Kandungan Flavonoid

- **Perhitungan Pembuatan Larutan NaNO_2 3 M**

$$\begin{aligned}
 m &= n \times Mr \\
 &= M \times V \times Mr \\
 &= 3 \times 0,1 \times 69 \left(\frac{\text{mol}}{L} \times L \times \frac{g}{\text{mol}} \right) \\
 &= 20,7 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

*Keterangan: m: massa; Mr: Massa molekul relatif; V: Volume H_2O

Perhitungan Pembuatan H_2SO_4 0,2 M

$$M \text{ H}_2\text{SO}_4 = \frac{n}{v}$$

$$M = \frac{mt \text{ (g)}}{Mr \left(\frac{g}{\text{mol}} \right) \times V \text{ (L)}}$$

$$M = \frac{mt \text{ (g)}}{mr \left(\frac{g}{\text{mol}} \right) \times v \text{ (L)}}$$

$$M = \frac{mt \text{ (g)} \times \rho \left(\frac{g}{\text{mL}} \right)}{ml \text{ (g)} \times mr \left(\frac{g}{\text{mol}} \right) \times v \text{ (L)}}$$

$$M = \frac{98 \times 1,84}{100 \times 98,08 \times 0,1} \left(\frac{g \times \frac{g}{\text{mL}}}{g \times \frac{g}{\text{mol}} \times L} \right)$$

$$M = 18,38 \text{ M}$$

Pengenceran H_2SO_4 18,30 M menjadi 0,2 M

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 18,30 \text{ M} = 0,1 \text{ L} \times 0,2 \text{ M}$$

$$V_1 = 1,09 \text{ mL}$$

* **Keterangan:** %: persentase konsentrasi H₂SO₄; M: Molar Konsentrasi H₂SO₄; ρ: densitas; Mr: Massa molekul relatif; V₁: Volume H₂SO₄ 18,30 M; V₂: Volume H₂O; M₁: Konsentrasi awal; M₂: Konsentrasi setelah pengenceran.

- **Pembuatan Larutan Standar Kuersetin**
- **Pembutan larutan stok 100 µg/mL**

$$100 \frac{\mu g}{mL} = 10^{-4} \frac{g}{mL} = 10^{-2} \frac{g}{100 mL}$$

Jadi pembuatan larutan stok kuersetin dilakukan dengan melarutkan 0,01 g kuersetin dalam beberapa mL pelarut, lalu diencerkan kembali hingga tanda batas labu ukur 100 mL.

- **Pengenceran larutan stok kuersetin 100 ppm menjadi konsentrasi 80,60,40 dan 20 ppm**

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \mu g/mL = 0,025 L \times 80 \mu g/mL$$

$$V_1 = 0,02 L$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \mu g/mL = 0,025 L \times 60 \mu g/mL$$

$$V_1 = 0,015 L$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} = 0,025 \text{ L} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,010 \text{ L}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

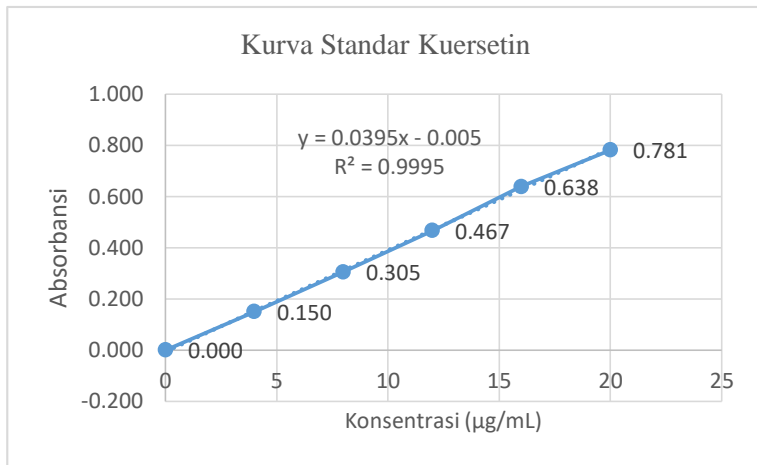
$$V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} = 0,025 \text{ L} \times 20 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,005 \text{ L}$$

*Keterangan: V_1 : Volume larutan stok; V_2 :
Volume pelarut; M_1 :
Konsentrasi larutan stok;
 M_2 : Konsentrasi setelah
pengenceran

- **Kurva Standar dan Total Kandungan Flavonoid**

Data Absorbansi Kurva Standar Kuersetin Ekstrak Propolis dalam Pelarut Metanol				
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi Ke			Absorbansi rata- rata
	1	2	3	
0	0	0	0	0,000
4	0,160	0,145	0,145	0,150
8	0,318	0,299	0,298	0,305
12	0,49	0,458	0,452	0,467
16	0,708	0,606	0,601	0,638
20	0,830	0,757	0,757	0,781



Nama Ekstrak	Absorbansi Ke			Absorbansi rata rata	SD
	1	2	3		
EPM _e	0,614	0,614	0,611	0,613	0,002

Konsentrasi (µg/mL)			Konsentrasi rata-rata	SD
1	2	3		
15,418	15,418	15,342	15,392	0,044

SLK (g)	FP	V (mL)	Total Kandungan Flavonoid (TKFL)			Rata-Rata	SD	TKFL Akhir (µg/g)
			1	2	3			
23,385	25	0,4	6,593	6,593	6,561	6,582	0,019	6,582 ± 0,019

Contoh Perhitungan Total Kandungan Flavonoid

$$TKFL = C \times V \times FP \times \frac{1}{SLK}$$

$$\begin{aligned} TKFL &= 15,418 \mu\text{g/mL} \times 0,4 \text{ mL} \times 25 \times \frac{1}{23,385 \text{ g}} \\ &= 6,593 \mu\text{g/g} \end{aligned}$$

Keterangan: C= Konsentrasi sampel yang didapat dari perhitungan persamaan regresi linier; V= Volume Ekstrak yang digunakan; FP= Faktor pengenceran; SLK= Sarang Lebah Kering; SD= Standar Deviasi; EPMe= Ekstrak Propolis Metanol

4. Uji Aktivitas Antioksidan

- Pembuatan larutan DPPH 60 μM

$$60 \mu\text{M} = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$m = n \times Mr$$

$$m = M \times V \times Mr$$

$$m = 6 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} \times 394,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m = 0,0024 \text{ gram}$$

- Data Uji Aktivitas Antioksidan

Nama Ekstrak	Absorbansi
DPPH + Metanol	0,565
EpMe (1)	0,098
EpMe (2)	0,098
EpMe (3)	0,098

- **Perhitungan % Dekolorisasi**

Nama Ekstrak	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel			Absorbansi Rata-Rata	SD
EPMe	0,565	0,098	0,098	0,098	0,098	0

% dekolorisasi			SD	% dekolorisasi rata-rata	% dekolorisasi
82,655	82,655	82,655	0	82,655	82,655

Perhitungan % dekolorisasi

- $\% \text{ dekolorisasi} = (1 - 0,098/0,565) \times 100$
 $= 82,655\%$

5. Analisis Total Protein

- **Pembuatan larutan stok BSA 1000 ppm**

$$1000 \text{ ppm} = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 10^{-1} \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Jadi pembuatan larutan stok BSA dilakukan dengan melarutkan 0,025 g asam galat dalam beberapa mL pelarut, lalu diencerkan kembali hingga tanda batas labu ukur 25 mL.

- **Pengenceran larutan stok BSA 1000 ppm menjadi konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 300 ppm**

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 0,010 \text{ L} \times 300 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,003 \text{ L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 0,010 \text{ L} \times 200 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,002 \text{ L} \end{aligned}$$

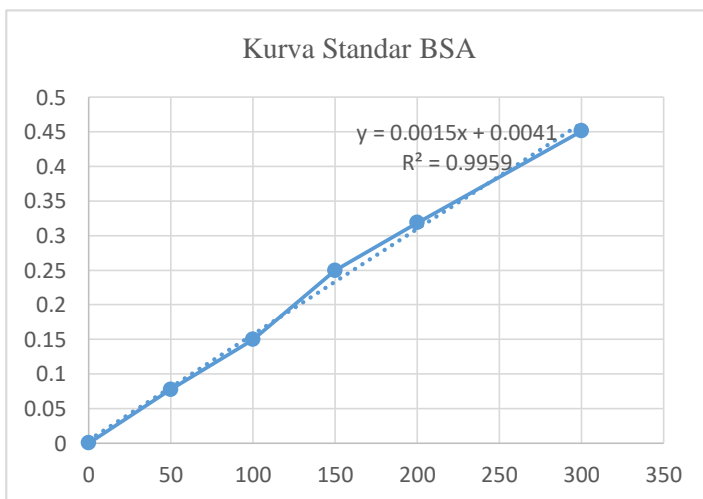
$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 0,010 \text{ L} \times 150 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,0015 \text{ L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 0,010 \text{ L} \times 100 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,001 \text{ L} \\ V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 0,010 \text{ L} \times 50 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= 0,0005 \text{ L} \end{aligned}$$

*Keterangan: V_1 : Volume larutan stok; V_2 : Volume pelarut; M_1 : Konsentrasi larutan stok; M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

- Kurva Standar dan Total Kandungan Protein

Data Absorbansi Kurva Standar Bovine Serum Albumin Ekstrak Propolis dalam Pelarut Metanol				
Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi Ke			Absorbansi rata rata
	1	2	3	
0	0	0	0	0,000
50	0.077	0.078	0.078	0.078
100	0.150	0.149	0.150	0.150
150	0.250	0.249	0.250	0.250
200	0.318	0.319	0.319	0.319
300	0.451	0.451	0.451	0.451



Nama Ekstrak	Absorbansi Ke			Absorbansi rata rata	SD
	1	2	3		
EPMe	0.179	0.179	0.179	0.179	0,000

Konsentrasi (µg/mL)			Konsentrasi rata-rata	SD
1	2	3		
116,6	116,6	116,6	116,6	0,000

SLK (g)	FP	V (mL)	Total Kandungan Protein			Rata-Rata	SD	TKP Akhir (µg/g)
			1	2	3			
23,385	5	1	24,931	24,931	24,931	24,931		24,931

Contoh Perhitungan Total Kandungan Protein

$$\begin{aligned}
 \text{TKP} &= C \times V \times \frac{1}{\text{SLK}} \times \text{fp} \\
 \text{TKP} &= 116,6 \text{ µg/mL} \times 1 \text{ mL} \times \frac{1}{23,385 \text{ g}} \times 5 \\
 &= 24,931 \text{ µg/g}
 \end{aligned}$$

Keterangan: C=Konsentrasi sampel yang didapat dari perhitungan persamaan regresi linier; V= Volume Ekstrak yang digunakan; FP= Faktor pengenceran; SLK= Sarang Lebah Kering; SD= Standar Deviasi; EPMe= Ekstrak Propolis Metanol

6. Fortifikasi Yoghurt

- pH yoghurt

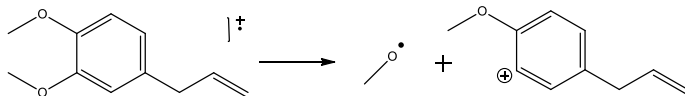
Nama Ekstrak	pH Hari Ke-						
	1	3	6	10	14	21	30
kontrol	6	5	4	4	4	4	4
EpMe + A	5	5	4	4	4	5	5
EpMe + B	5	5	4	4	4	5	5
EpMe + C	5	5	4	4	4	5	5

- Tabel % Dekolorisasi

mL penambahan EpMe	% Dekolorisasi Hari Ke-					
	3	6	10	14	21	30
0 (kontrol)	0.092	3.756	8.333	9.499	10.583	10.924
40 (A)	59.504	78.932	51.304	56.991	57.161	58.177
80 (B)	61.295	80.810	57.174	82.713	83.080	83.521
100 (C)	82.920	83.803	86.087	87.080	87.576	87.953

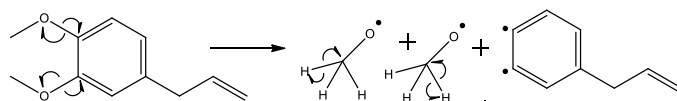
• Fragmentasi KG-SM

Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-

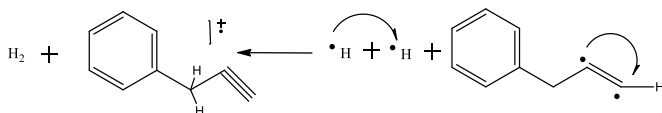
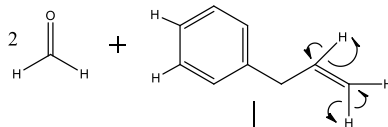
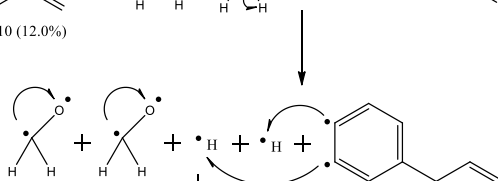


m/z: 178.10 (100.0%), 179.10 (12.0%)

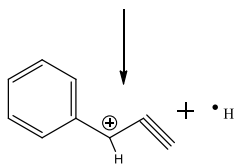
m/z: 147



m/z: 178.10 (100.0%), 179.10 (12.0%)

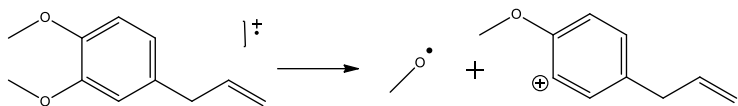


m/z: 116.06 (100.0%), 117.07 (9.8%)



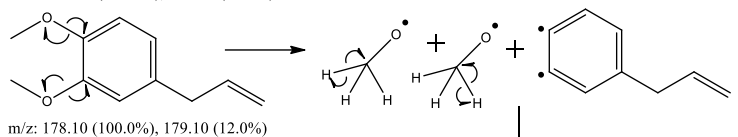
m/z: 115

Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-

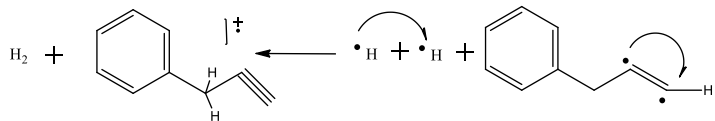
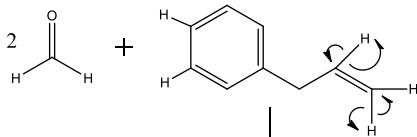
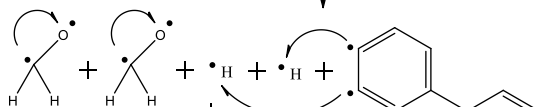


m/z: 178.10 (100.0%), 179.10 (12.0%)

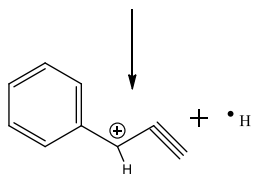
m/z: 147



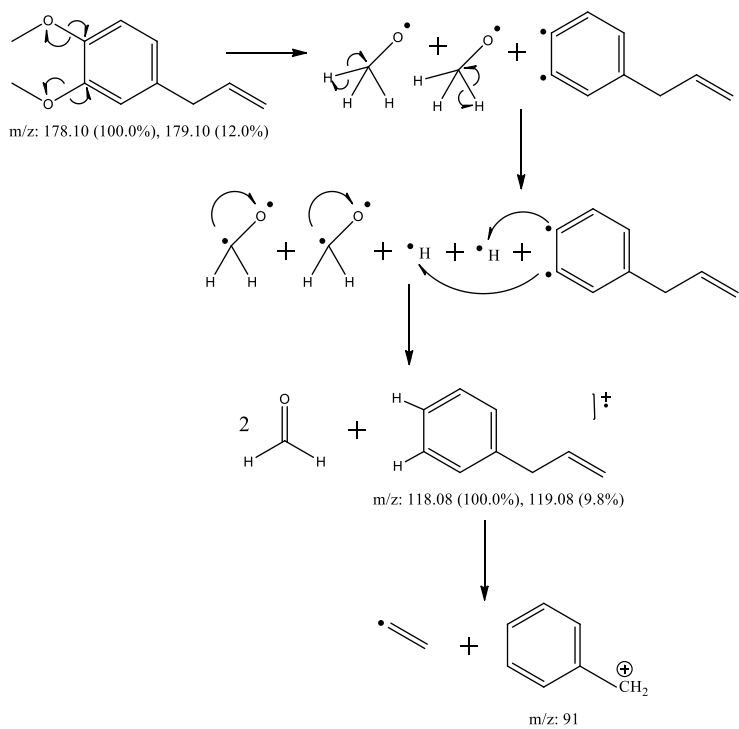
m/z: 178.10 (100.0%), 179.10 (12.0%)

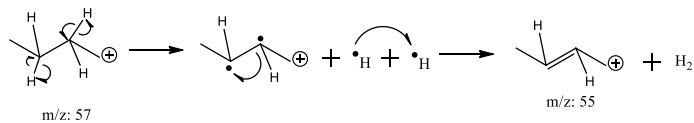
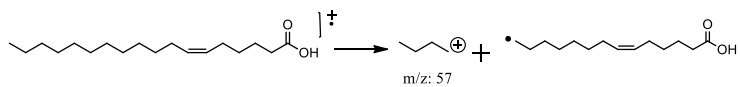
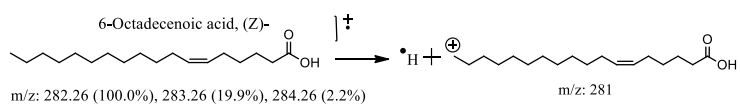
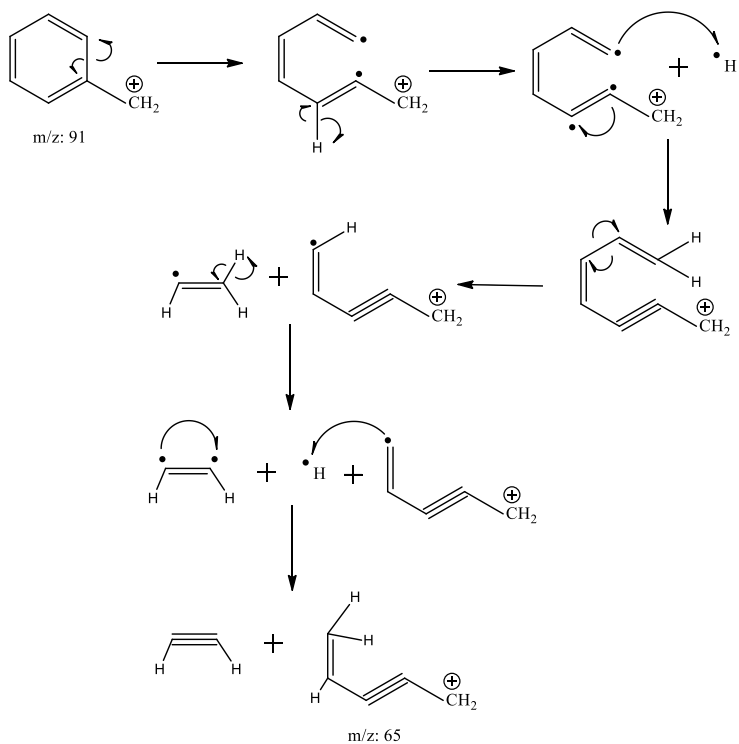


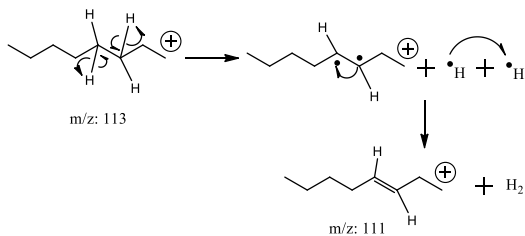
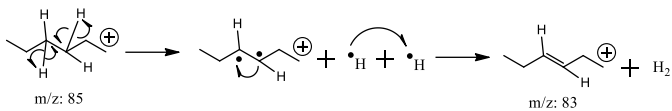
m/z: 116.06 (100.0%), 117.07 (9.8%)

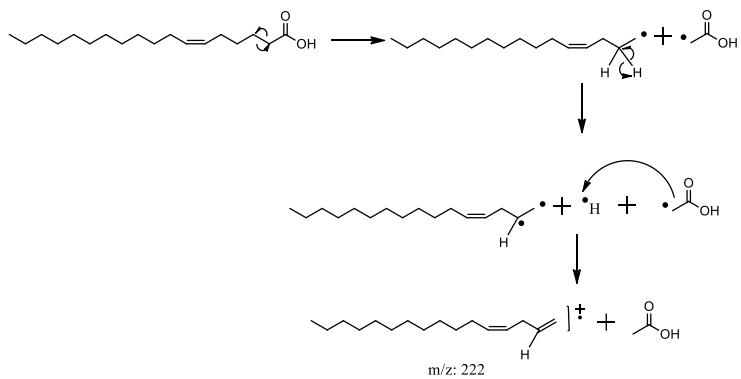


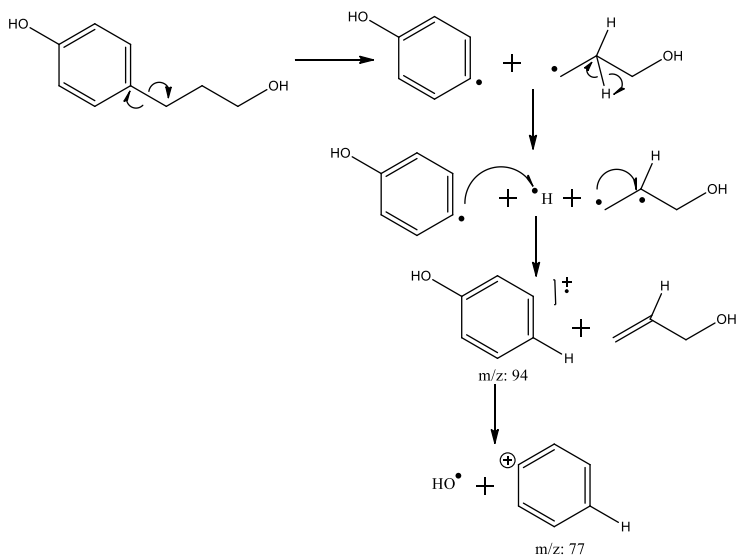
m/z: 115

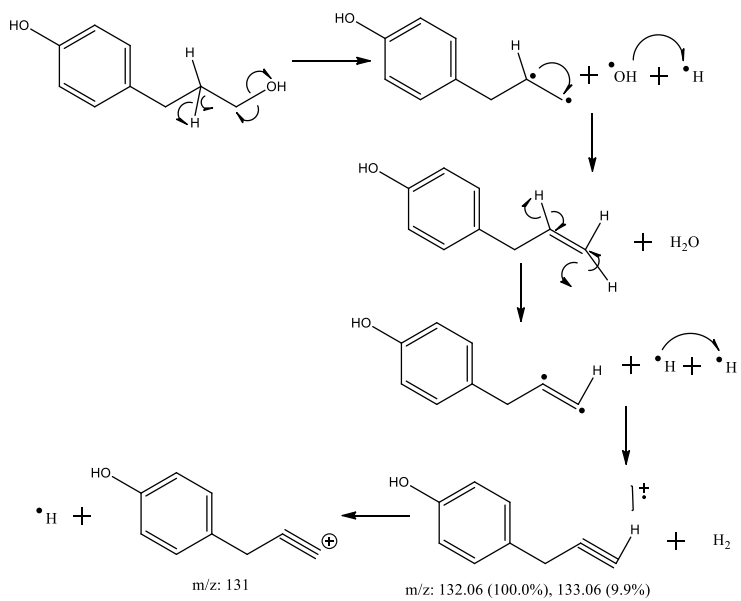












BIODATA PENULIS



Penulis bernama Nia Paramitha. Penulis yang dilahirkan di Tangerang, 12 Juni 1996 ini merupakan anak tunggal dari pasangan Anim Mulyana dan Nining Ratnaningrum. Penulis telah menempuh pendidikan formalnya di TK Kartini Bogor (2000-2001), SDIT Baitussalam (2001-2004), SDN Polisi 4 Kota Bogor (2005-2007) SMP Negeri 4 Bogor (2007-2010) dan SMK SMAK Bogor (2010-2014). Penulis melanjutkan jenjang pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA ITS melalui jalur PKM dan terdaftar dengan Nomor Registrasi Pokok (NRP) 01211440000096. Pada tahu kedua dan ketiga penulis aktif sebagai presenter dan reporter ITS TV ([youtube.com/eurekatvits](https://www.youtube.com/eurekatvits)) dan memegang amanah sebagai sekretaris selama 2 tahun. Pada tahun kedua dan ketiga penulis juga aktif mengikuti kepanitiaan dari berbagai acara yang diselenggarakan di lingkungan Jurusan, Fakultas dan Institut seperti Chemistry Week, PETROLIDA, YES Summit, dan AYCF. Penulis pernah menjalani kerja praktik di Laboratorium PDAM Tirta Pakuan Kota Bogor . Penulis menyelesaikan program Sarjana dengan mengambil tugas akhir di bidang Geokimia Organik Molekuler dibawah bimbingan Zjahra Vianita Nugraheni, M.Si. dan Herdayanto Sulistyio Putro, M.Si. Penulis dapat dihubungi melalui email: niaparamithamulyana@gmail.com.